

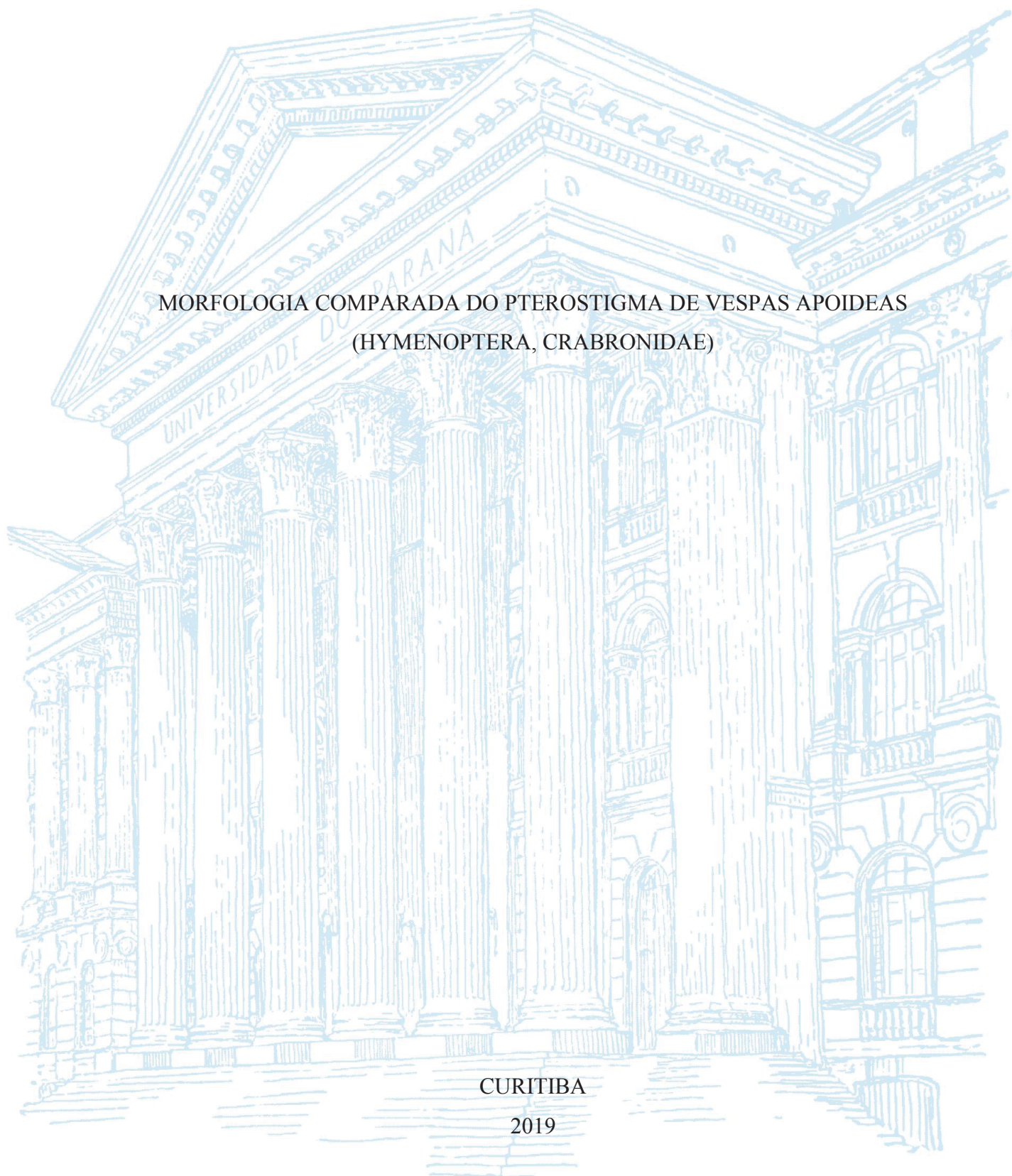
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAYRINE LUANE MARTINS SARDINHA

MORFOLOGIA COMPARADA DO PTEROSTIGMA DE VESPAS APOIDEAS  
(HYMENOPTERA, CRABRONIDAE)

CURITIBA

2019



THAYRINE LUANE MARTINS SARDINHA

MORFOLOGIA COMPARADA DO PTEROSTIGMA DE VESPAS APOIDEAS  
(HYMENOPTERA, CRABRONIDAE)

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Entomologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Entomologia.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Augusto Rodrigues de Melo  
Coorientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Sardinha, Thayrine Luane Martins

Morfologia comparada do pterostigma de vespas apoideas  
(Hymenoptera, Crabronidae). / Thayrine Luane Martins Sardinha. –  
Curitiba, 2019.  
66 p. : il.

Orientador: Gabriel A. R. Melo

Coorientador: Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Entomologia

1. Himenoptero 2. Vespa 3. Histologia 4. Atrativos sexuais 5.  
Glândulas exócrinas I. Título II. Melo, Gabriel Augusto Rodrigues de. III.  
Ribeiro, Ciro Alberto de Oliveira, 1960- IV. Universidade Federal do  
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em  
Entomologia.

CDD (22. ed.) 595.798



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(ENTOMOLOGIA) - 40001016005P5

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ENTOMOLOGIA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **THAYRINE LUANE MARTINS SARDINHA** intitulada: **Morfologia comparada do pterostigma de vespas apoideas (Hymenoptera, Crabronidae)**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Fevereiro de 2019.

GABRIEL AUGUSTO RODRIGUES DE MELO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

RODRIGO BARBOSA GONÇALVES

Avaliador Interno (UFPR)

LUIS FERNANDO FÁVARO

Avaliador Externo (UFPR)

EDUARDO ANDRADE BOTELHO DE ALMEIDA

Avaliador Externo (USP)



Este trabalho é dedicado à minha estrelinha, vovó Dulcina Ferreira.

## AGRADECIMENTOS

Quando se chega à conclusão de uma etapa tão importante e esperada, muitas coisas vêm à memória. O início da caminhada, ainda sem muita experiência, desafios, conquistas, alegrias e tristezas, até o presente momento. Com o meu coração de manteiga e com algumas lágrimas ao escrever essas linhas, agradeço a todos que participaram de alguma forma dessa fase. Agradeço, acima de tudo, a alguma energia positiva que permite que tudo isso aconteça e por estar refletida diariamente nas coisas que eu mais amo na vida: minha família, amigos, meus animais, os insetos e todo o restante da natureza.

Cheguei aqui, mas não sozinha, represento a minha família e sua trajetória, a eles também agradeço. Em especial à minha avó, a qual perdi durante os anos de mestrado, mas que me impulsionou a continuar seguindo em frente. Que amor eu sinto. Ao meu avô, que facilmente poderia ser um naturalista ou um poeta, pra mim ele já é as duas coisas. E claro, à minha mãe, razão pela qual estou aqui e minha inspiração diária de luta, amor ao próximo e felicidade. E sorriso! Ahh... esse sorriso!

Agradeço ao meu orientador, Dr. Gabriel A. R. Melo, pela oportunidade de trabalho, ensinamentos, paciência e pela coragem de me ter como aluna. É muito mais prazeroso trabalhar com quem você admira. Agradeço também a todos meus amigos do LBCH: André Martins, Brunno Bueno, Cindy Celis, David Muniz e David Luz. Cafezinhos, brincadeiras, saídas, tudo isso ameniza essa fase tão intensa. Aqui fiz amizades verdadeiras. Agradeço ao meu coorientador, Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, por ter aceitado fazer parte desse desafio junto com a gente. Por toda a infraestrutura do Laboratório de Toxicologia Celular e pela paciência e boa vontade diante de todas as tentativas não exitosas. Agradeço imensamente a todos os alunos do laboratório da Biologia Celular que me fizeram sentir à vontade em momentos que me sentia um peixe fora d'água. Por todas as dicas de procedimentos e momentos de descontração. Em especial à Tugstênio Lima, Patrícia Manuitt e Joelma Leão-Buchir.

De São Luís não trago somente minhas raízes, mas também muito amor e amizade. Com muito amor agradeço a duas pessoas incríveis que me acompanham sempre: Elias da Costa e Eliberto Castro. Obrigada por tudo! Agradeço também às minhas amigas que tanto me apoiaram em dias que era difícil estar longe de casa. Obrigada, Andressa Cartagenes, Mairla Colins, Gabriela Almeida e Emilly Moraes. Agradeço também aos meus amigos do coração, Lucas Martins e Diego Marinho, pela amizade e contribuições no texto. Além de amigos maravilhosos, são algumas das minhas inspirações como profissionais.

Agradeço ao meu núcleo de convivência latino-americano. Mesmo sendo dos mais diferentes países, sempre me fizeram sentir em casa. Obrigada por todas as dicas e aprendizados de espanhol. Em especial agradeço aos meus colombianos queridos que, sem dúvidas, foram algumas das melhores pessoas que conheci por aqui. Às minhas *roommates* Cindy Celis e Martha Erazo, e também a Julián Olaya e Alejandro Restrepo. Los quiero!

À minha bonequinha, princesa de mãe, minha gatinha Arya! Que acompanhou tudo de perto e foi a melhor companhia que poderia ter.

Às amizades feitas no PGEnto, em especial Amanda Martins e Adalberto Dantas, por tantos sufocos e conhecimentos compartilhados. Ao PPG em Entomologia e professores que contribuíram com minha formação. Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca, Dr. Eduardo Almeida, Dr. Rodrigo Gonçalves, Dr. Luis Fernando Fávaro e Dr. Rodrigo Feitosa, pelas contribuições.

Grata!

“Que bom seria se as casas dos humanos fossem como *chapim de caba*. A casinha é frágil. Mas no fim do dia, quando todas voltam do trabalho, tem lugar pra cada uma dormir e todo mundo coopera com alegria (...)”  
(Vovô Lucelino Martins, 2018)



## RESUMO

Em diversos grupos de insetos, em especial a ordem Hymenoptera, há uma região na asa pigmentada e esclerotizada denominada pterostigma. Embora seja uma característica conspícua para o grupo, estudos morfológicos comparativos nos quais essa estrutura fosse principal interesse ainda não haviam sido desenvolvidos. Neste sentido, utilizamos ferramentas alternativas de estudo morfológico, histologia e microscopia eletrônica, para fornecer descrições do pterostigma para Hymenoptera. Fornecemos aqui a descrição histológica de estigmas de nove espécies de vespas apoideas, além de duas espécies de abelhas. Com especial ênfase na subtribo Stigmina, reportamos a presença de epiderme glandular associada a um campo de microporos localizados nas superfícies dorsal e ventral do pterostigma. Adicionalmente, fornecemos a codificação de seis caracteres oriundos da morfologia externa, que poderão ser incorporados em futuras análises filogenéticas da subtribo. A partir destes resultados, foram feitas inferências funcionais para as glândulas dos Stigmina, bem como o relato da sua modificação dentro do grupo. Aqui, reconhecemos uma função adicional para o pterostigma, a comunicação química. Fomentamos também a importância de estudos comparativos utilizando esta estrutura, a qual se mostrou uma fonte de caracteres úteis para a delimitação de grupos.

Palavras-chave: Histologia, Feromônio, Glândulas exócrinas, Microscopia, Insecta

## **ABSTRACT**

Several groups of insects, and particularly the order Hymenoptera, bear a pigmented and sclerotized area in the wings, called pterostigma. It is a ubiquitous feature for the order; however, no study concerning this structure has been carried out. In that account, this research uses alternative tools of morphological study methods, histological and electronic microscopy, for providing descriptions of the Hymenoptera's pterostigma. The histological description of nine species of Apoidea wasps is presented, as well as of two bee species. Focusing specifically in the subtribe Stigmina, we reported the presence of glandular epidermis associated with a region with micropores on the ventral and dorsal surfaces of the pterostigma. Additionally, we provide six characters coded from external morphology that may be used in future phylogenetic analyses of the subtribe Stigmina. These results allowed functional inferences for glands of the subtribe Stigmina, as well as their modifications within the group. We also point out an additional function for the pterostigma, chemical communication. In conclusion, we stress out the importance of comparative studies concerning this structure, since it is a useful source of characters for delimiting groups.

**Keywords:** Exocrine Glands, Histology, Insecta, Microscopy, Pheromone

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Esquema filogenético que resume as linhagens de Apoidea utilizadas no presente estudo. \* Subfamília na qual estão inseridos os representantes de Stigmina ... 6
- Figura 2 Eletromicrografia (Microscopia Eletrônica de Varredura) mostrando a asa anterior de *Incastigmus neotropicus* (Kohl, 1890), ilustrando as oito regiões de cortes transversais efetuados no pterostigma. Escala: 100µm ..... 12
- Figura 3 Eletromicrografia (Microscopia Eletrônica de Varredura) da asa anterior de *Incastigmus neotropicus* (Kohl, 1890), indicando as quatro regiões de cortes transversais efetuados no pterostigma. .... 12
- Figura 4 Cortes semifinos do pterostigma de *Stigmus* sp. Regiões 1 (A–B) e 2 (C) Cortes transversais do pterostigma: (epi) epiderme, (\*) nervos; Região 3 (D–G) pterostigma: (tpi) Tecido de preenchimento intermediário, (\*) grânulos de pigmento, (hemo) espaço de pass ..... 15
- Figura 5 Cortes semifinos do pterostigma de *Stigmus* sp. Região 4 (A–D): (A e B) (gl) células secretoras; (C) (cmv) (gl) células secretoras ligadas ao campo de microporos ventral (cmv), (seta) gotículas de lipídeo; (D) (pig) grânulos de pigmento, (tpi) tecido de preenchimento intermediário. Região 5 (E e F) interseção de glândulas dorsal e ventral. Escala: 20µm ..... 16
- Figura 6 Cortes semifinos do pterostigma de *Stigmus* sp. Regiões 5 e 6 (A– E): (A) (pig) grânulos de pigmento; (tpi) tecido de preenchimento intermediário; (B–E) (gl) epiderme glandular ligada ao campo de microporos dorsal (cmd), (B) (\*) região basal celular estreita, (seta) gotículas de lipídeo; (D e E) (sens) ligação ao sensor externa. Escalas: Figs. A, B, D e E: 20µm; Fig. C: 50µm..... 17
- Figura 7 Cortes semifinos do pterostigma de *Stigmus* sp. Região 7 (A– D): (tpi) tecido de preenchimento intermediário, (\*) células associadas à base. Região 8 (E e F) (pig) grânulos de pigmento, (tpi) tecido de preenchimento intermediário, (hemo) espaço de passagem de hemolinfa. Escalas: Figs. A, C, D e F: 20µm; B, C e E: 50µm ..... 18
- Figura 8 Eletromicrografia (Microscopia Eletrônica de Transmissão) do pterostigma de *Stigmus* sp. (A– E): (A) (epi)epiderme, células dispersas; (B) (endocut) endocutícula, (nu) núcleo celular achatado; (C e D) (setas) microporos na cutícula; (E) (pig) grânulos de pimento. Escalas: Fig. A: 5µm; Figs. B, C e E: 2 µm; Fig. D: 1µm ..... 19

- Figura 9 Cortes semifinos do pterostigma de *Incastigmus ictericornis* (A– D): (A e B) (seta) quebras de cutículas, (gl) células secretoras ligadas ao campo de microporos ventral (cmv), (\*) núcleo; (C e D) (tpi) tecido de preenchimento intermediário, (gl) células secretoras epiderme glandular ligadas ao campo de microporos dorsal (cmd), (seta) gotículas de lipídeo. Escalas: Figs. A e D: 20 µm, Figs. B e C: 50 µm .....20
- Figura 10 Cortes semifinos do pterostigma de *Incastigmus neotropicus* (A– E): (A–D) (gl) células secretoras; (seta) núcleo; (pig) grânulos de pigmento; (E) (sens) ligação ao sensor externa. Escalas: Figs. A e C: 50 µm, Figs. B, D e E: 20 µm .....21
- Figura 11 Cortes semifinos do pterostigma de *Incastigmus neotropicus* (A– E): (tpi) tecido de preenchimento intermediário, (pig) grânulos de pigmento, (hemo) espaço para passagem de hemolinfa. Escalas: Fig. A: 50 µm, Figs. B –E: 20 µm .....22
- Figura 12 Cortes semifinos do pterostigma de *Llaqhastigmus mantanti* (A–F) (gl) células secretoras em campo de microporos dorsal (cmd) e ventral (cmv), (tpi) tecido de preenchimento intermediário, (sens) ligação ao sensor externo, (pig) grânulos de pigmento. Escala: Fig. A: 50µm; Figs. B–F: 20µm .....23
- Figura 13 Cortes semifinos do pterostigma de *Llaqhastigmus mantanti*: (A–D) (gl) células secretoras, (tpi) tecido de preenchimento intermediário (tpi), (pig) grânulos de pigmento. Escalas: Figs: A, C e D: 20µm; Fig. B: 50 µm.....24
- Figura 14 Eletromicrografia (Microscopia Eletrônica de Varredura) do pterostigma de *Incastigmus pycnoglypticus*: (A–C) (cmd) campo de microporos dorsal, (\*) cerdas sobre o pterostigma, (seta) sensores campaniformes. (D–F) (cmv) campo de microporos ventral. ....26
- Figura 15 Eletromicrografia (Microscopia Eletrônica de Varredura) do pterostigma de *Incastigmus neotropicus*: (A–C) (cmd) campo de microporos dorsal, (\*) cerdas sobre o pterostigma, (seta) sensores campaniformes. (D–F) (cmv) campo de microporos ventral. ....27
- Figura 16 Eletromicrografia (Microscopia Eletrônica de Varredura) do pterostigma de *Llaqhastigmus mantanti*: (A–C) (cmd) campo de microporos dorsal, (\*) cerdas sobre o pterostigma, (seta) sensores campaniformes; (D–F) (cmv) campo de microporos ventral. ....28
- Figura 17 Eletromicrografia (Microscopia Eletrônica de Varredura) ilustrando caracteres do pterostigma de Stigmina: (A–B) pterostigma de *Allostigmus*; (C–D)



pterostigma de <i>Araucastigma</i> ; (E–F) pterostigma de <i>Parastigma</i> ; (G–H) pterostigma de <i>Incastigma</i> .	31
Figura 18 Cortes semifinos do pterostigma de <i>Spilomena</i> sp. (A–G): (setas) tecido amorfo; (*) grânulos de pigmento; (tpi) tecido de preenchimento intermediário. Escala: Figs. A e E: 50µm; Figs: B, C, D, F e G: 20µm	33
Figura 19 Cortes semifinos do pterostigma de <i>Cerceris</i> sp. (A–D): (*) epiderme; (cel) célula associada a grânulos de pimento, (ct) cutícula. Escala: 20µm	34
Figura 20 Cortes semifinos do pterostigma de <i>Oxybelus</i> sp. (A–D): (*) grânulos de pigmento; (hemo) espaço de passagem de hemolinfa; (tpi) tecido de preenchimento intermediário (ct) cutícula. Escalas: Fig. A: 50µm; Figs. B–D: 20µm	35
Figura 21 Cortes semifinos do pterostigma de <i>Ectemnius</i> sp. (A–E): (epi) epiderme, (*) células dispersas com núcleo evidente, (tpi) tecido de preenchimento intermediário, (ct) cutícula, (hemo) espaço de passagem de hemolinfa. Escalas: 20µm	36
Figura 22 Cortes semifinos do pterostigma de <i>Rhopalum</i> sp. (A–D): (*) células dispersas com núcleo evidente, (setas) tecido apical e basal, (tpi) tecido de preenchimento intermediário, (ct) cutícula Escalas: 20 µm	37
Figura 23 Cortes semifinos do pterostigma de <i>Hylaeus</i> sp. (A–D): (tpi) tecido de preenchimento intermediário, (pig) grânulos de pigmento, (ct) cutícula, (hemo) espaço de passagem de hemolinfa. Escalas: Figs. A, B e D: 20µm; Fig. C: 50µm	38
Figura 24 Cortes semifinos do pterostigma de <i>Chilicola</i> sp. (A–D): (*) células dispersas com núcleo evidente, (#) tecido apical e basal triangulares, (tpi) tecido de preenchimento intermediário, (pig) grânulos de pigmento, (ct) cutícula, (hemo) espaço de passagem de hemolinfa. Escala: 20µm	39
Figura 25 Artefatos de inclusão em espécies de Stigmina: (A e B) (setas) dobras e rasgos em imagens de ultraestrutura; (C e E), (*) cortes semifinos desprendendo-se da resina; (D) (*) dificuldades de preservação de estruturas internas; (F)(seta) completa não-inclusão do material biológico na resina (res). Escalas: Fig. A: 5µm; Fig.B: 10 µm; Figs. C–F: 50 µm	62
Figura 26 Hábito em vista lateral e cabeça em vista frontal de espécies de vespas apoideas do gênero <i>Incastigma</i> (A–F): (A, B) <i>Incastigma pycnoglypticus</i> (fêmea); (C, D) <i>I. ictericornis</i> (macho); (E, F) <i>I. ictericornis</i> (fêmea). Escalas: Figs. A, C e E 1,0mm e Figs. B, D e F: 0,5mm	63

- Figura 27 Hábito em vista lateral e cabeça em vista frontal de espécies de vespas apoideas dos gêneros *Incastigmus*, *Llaqhastigmus* e *Stigmus* (A–F): *I. neotropicus* (macho); (C, D) *Llaqhastigmus mantanti* (fêmea); (E, F) *Stigmus* sp (macho). Escalas: Figs. A, C e E 1,0mm e Figs. B, D e F: 0,5mm..... 64
- Figura 28 Hábito em vista lateral e cabeça em vista frontal de espécies de vespas apoideas dos gêneros *Spilomena*, *Rhopalum* e *Oxybelus* (A–F): (A, B) *Spilomena* sp. (fêmea); (C, D) *Rhopalum* sp. (macho) e (E, F) *Oxybelus* sp. (macho). Escalas: Figs. A,B,D, E 0,5mm; C 1,0mm e Figs. B, D e F: 0,5mm..... 65
- Figura 29 Hábito em vista lateral e cabeça em vista frontal de espécies de vespas apoideas e abelhas dos gêneros *Ectemnius*, *Cerceris*, *Hylaeus* e *Chilicola* (A–H): (A, B) *Ectemnius* sp. (fêmea); (C, D) *Cerceris* sp. (macho); (E, F) *Hylaeus* sp. (fêmea); (G, H) *Chilicola* sp. (macho). Escalas: Figs. A, B,C, D, E, G 1,0mm;Figs. F e H, 0,5mm..... 66

## LISTA DE TABELAS

- Tabela I Material utilizado para descrição do pterostigma em linhagens de Apoidea.  
Microscopia de Luz (ML) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).  
..... **Erro! Indicador não definido.**
- Tabela II Matriz de dados dos caracteres codificados a partir do pterostigma de Stigmina. ...30

## SUMÁRIO

<b>1 . Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 O pterostigma.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Glândulas exócrinas .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Aplicação de estudos em morfologia comparada para inferências filogenéticas.....</b>	<b>4</b>
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Geral .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Específicos .....</b>	<b>5</b>
<b>3 Material e Métodos.....</b>	<b>6</b>
<b>3.1 Amostragem taxonômica e estrutura de interesse: obtenção do material .....</b>	<b>6</b>
<b>3.2 Estudo histológico: Microscopia de Luz (ML) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....</b>	<b>9</b>
3.2.1 Fixação e inclusão em resina .....	9
3.2.2 Microtomia e registro de imagens .....	9
3.2.2.1 Cortes semifinos.....	9
3.2.2.2 Cortes ultrafinos .....	10
<b>3.3 Morfologia comparada: codificação de caracteres em Stigmina .....</b>	<b>10</b>
<b>3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....</b>	<b>10</b>
<b>3.5 Vetorização e análise dos dados .....</b>	<b>11</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>13</b>
<b>4.1 Descrição estrutural e aspectos ultra-estruturais do pterostigma em espécies de Stigmina.....</b>	<b>13</b>
4.1.2 Morfologia externa do pterostigma de espécies de Stigmina.....	24
<b>4.2 Codificação de caracteres em Stigmina .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3 Morfologia comparada do pterostigma em linhagens de Apoidea.....</b>	<b>32</b>
<b>5 Discussão .....</b>	<b>40</b>
<b>5.1 Estrutura e aspectos ultra-estruturais de glândulas em Stigmina .....</b>	<b>40</b>
<b>5.2 Codificação de caracteres em Stigmina .....</b>	<b>43</b>
<b>5.3 Morfologia comparada do pterostigma em linhagens de Apoidea.....</b>	<b>45</b>
<b>6 Conclusões .....</b>	<b>49</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>50</b>
<b>Apêndice A – Protocolo para fixação, inclusão, corte e coloração de asas Em Apoidea</b>	<b>56</b>



<b>Apêndice B – Formulação e tempos de ação de reagentes .....</b>	<b>59</b>
<b>Apêndice C – Dificuldades metodológicas em inclusão.....</b>	<b>61</b>
<b>Apêndice D – Indivíduos utilizados para descrição do pterostigma em Hymenoptera ...</b>	<b>63</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O pterostigma

Dentro da história evolutiva dos insetos, um dos eventos que merece grande destaque é a origem e desenvolvimento do voo. De fato, o voo permitiu aos insetos uma maior capacidade de dispersão, o que levou à grande diversificação das linhagens em Pterygota (GRIMALDI & ENGEL, 2005). Esta novidade evolutiva está associada a uma estrutura que tradicionalmente desperta fascínio em entomólogos: a asa dos insetos. Do ponto de vista estrutural, a asa dos insetos é constituída por uma fina camada membranosa sustentada por veias alares longitudinais, sendo estas reforçadas por veias transversais (CHAPMAN, 1982). As veias, além da sustentação, têm importante função transportadora, uma vez que apresentam um canal interno preenchido com traqueia, hemolinfa e nervos (CHAPMAN, 1982; APPEL et al., 2015). Embora possua função clara para a locomoção, a asa dos insetos ainda pode exibir outras funções biológicas, como proteção e defesa, termorregulação e display sexual (PASS, 2018).

Nas asas de insetos pertencentes a ordens não intimamente relacionadas, especialmente Odonata, Neuroptera, Psocoptera, Trichoptera, Hemiptera e Hymenoptera, há uma região denominada pterostigma ou stigma (NEEDHAM, 1903; DANFORTH, 1988; WOOTTON, 1992). Comstock (1918), por exemplo, definiu o pterostigma como um ponto opaco com maior espessamento localizado próximo ao ápice da asa. Esta estrutura pode estar presente nas asas dianteiras da maioria dos Hymenoptera e em alguns Hemiptera (Auchenorrhyncha); e em ambas as asas da maioria dos Odonata e de algumas famílias de Neuroptera (ARNOLD, 1963).

Muito já foi especulado sobre a função do pterostigma. No entanto, acredita-se que, devido à sua localização no ponto de maior impacto contra o ar, esta estrutura atue como um regulador inerte do voo dos insetos, aumentando assim a eficiência da asa (NORBERG, 1972; WOOTTON, 1992). O pterostigma dos Odonata está entre os mais estudados do ponto de vista funcional e morfológico, o que se deve principalmente ao tamanho dos indivíduos desta ordem e sua facilidade de manuseio (NORBERG, 1972). No que se refere às outras ordens de insetos, poucos pesquisadores realizaram uma análise detalhada desta região, sendo que há poucos trabalhos em que o pterostigma seja o principal interesse.

Mesmo escassos, alguns trabalhos lançam luz sobre a função do pterostigma. Por exemplo, Arnold (1963) forneceu informações comparativas entre diversas ordens de

insetos sobre a circulação da hemolinfa dentro desta estrutura. A morfologia externa também foi investigada para as ordens Odonata (HEYMER, 2009; ZHAO et al. 2010) e Trichoptera (BICCHIERAI & MORETTI, 1988). Do ponto de vista histológico, houveram descrições de características teciduais, mesmo que o pterostigma não tenha sido o principal interesse (BICCHIERAI & MORETTI, 1988; FRANIELCZYK-PIETYRA & WEGIEREK, 2017).

Em Hymenoptera, o pterostigma pode ser caracterizado como uma mancha pigmentada na asa dianteira localizada a aproximadamente dois terços da margem anterior (FERNÁNDEZ & SHARKEY, 2006). De acordo com Arnold (1963), o pterostigma dos himenópteros assemelha-se ao dos pulgões em forma, fora isso, há pouco em comum entre eles. No entanto, pode ainda apresentar uma ligeira semelhança superficial com o pterostigma das ordens Neuroptera e Odonata.

Embora o pterostigma seja uma característica conspícua e frequentemente utilizada como caráter em distinções da taxonomia clássica de Hymenoptera, estudos visando investigar sua estrutura, biomecânica e função ainda são raros. Informações estruturais do pterostigma de Hymenoptera foram fornecidas em trabalhos clássicos com utilização de amplos grupos de insetos (DANFORTH, 1988; WOOTON, 1992). Já do ponto de vista histológico, não há descrições das características celulares desta ordem, mas o primeiro passo foi dado por Melo (1999). Neste trabalho, são fornecidos cortes histológicos de indivíduos pertencentes à subfamília Pemphredoninae (Crabronidae). O autor reconhece a presença de epiderme glandular no interior do pterostigma de indivíduos da subtribo Stigmina.

A subtribo Stigmina compreende 122 espécies de vespas pequenas (3-5mm) com ampla distribuição, exceto nas regiões polares (FINNAMORE, 1995; PULAWSKI, 2018). Estes indivíduos, como o próprio nome sugere, apresentam um stigma (= pterostigma) bastante desenvolvido e espesso dorso-ventralmente. A única filogenia proposta até hoje foi fornecida pelo estudo de Finnamore (1995), no qual o autor reconhece 11 gêneros para o grupo. No entanto, há pouca resolução no que se refere ao gênero *Stigmaeus* Panzer, 1804, que foi reconhecido como sendo parafilético. Depois deste, nenhum outro trabalho visou reconhecer potenciais características que auxiliassem no entendimento da história evolutiva do grupo. Além disso, a história de vida de muitos gêneros de Stigmina não é perfeitamente compreendida, embora haja menção de cuidado parental e cooperação (BOHART & MENKE, 1976; MELO 2000). Ainda no trabalho de Melo (1999) o autor sugere que as glândulas encontradas no

pterostigma podem estar presentes nos outros representantes da subtribo Stigmina, instigando uma melhor investigação da distribuição desse caráter dentro do grupo.

## 1.2 Glândulas Exócrinas

“Glândula” é uma palavra frequentemente utilizada com diferentes conotações na área da biologia celular. Noirot & Quennedey (1991), a fim de organizar o conhecimento e facilitar estudos comparativos em insetos, atribuem o conceito de glândula a qualquer estrutura glandular que vai desde uma célula única a um complexo de células que estão associadas ao armazenamento, emissão ou evaporação de uma secreção.

As glândulas exócrinas originam-se de uma diferenciação do epitélio de revestimento. Estas células permanecem conectadas à superfície epitelial pela presença facultativa de um ducto de secreção (LEVINSON & LEVINSON, 1995; GENESER, 2003). Inicialmente, classificações baseadas na anatomia e função foram usadas no intuito de descrever as glândulas exócrinas. No entanto, essa abordagem não era satisfatória, visto que as correspondências não eram válidas entre as diferentes ordens de insetos, além de que uma mesma glândula pode assumir funções distintas (NOIROT & QUENNEDEY, 1991; QUENNEDEY, 1998). Dessa forma, tradicionalmente, a classificação das glândulas exócrinas é feita a partir da morfologia das células secretoras que foram distinguidas nos trabalhos pioneiros e clássicos de Noirot e Quennedey (1974, 1991).

Para os insetos, as glândulas exócrinas são estruturas com importância amplamente reconhecida para a produção das moléculas que auxiliam na comunicação química entre estes animais, os feromônios (BILLEN & MORGAN, 1998; SYMONDS & ELGAR, 2008). Contudo, a importância destas glândulas vai além desse tipo específico de comunicação, servindo também para produção de material para construção de ninhos, enzimas digestivas, venenos e outras substâncias defensivas, substâncias utilizadas durante a cópula, entre outras (BILLEN, 2006).

Para a ordem Hymenoptera, há uma extensa literatura acerca da descrição estrutural, função e compostos secretados por glândulas exócrinas. Woodard e colaboradores (2011) comentam que os genes associados ao desenvolvimento de glândulas parecem ter sido forte alvo de seleção durante a evolução de grupos de himenópteros sociais. Isto era de se esperar, visto que as espécies sociais utilizam em grande quantidade os produtos das secreções glandulares para uma complexa



organização e comunicação dentro das colônias (LEONHARDT et al., 2016). Mesmo pequenos, estes organismos podem conter mais de 20 glândulas exócrinas, o que explica a denominação de baterias glandulares ambulantes, como mencionado por Billen (1991).

Enquanto os himenópteros sociais dispõem de diversas informações glandulares, com mais de 100 glândulas descritas (BILLEN & SOBOTNÍK, 2015), himenópteros solitários apresentam poucos sistemas de glândulas detalhadamente estudados (BILLEN et al., 2017). De fato, a maioria das informações restringe-se apenas ao registro de ocorrência da estrutura (BILLEN, 2006). No entanto, é válido ressaltar que, mesmo a passos curtos, o estudo de glândulas exócrinas de grupos solitários vem se fortalecendo. Nos últimos anos, novas contribuições tem nos ajudado a entender o papel dessas glândulas para a comunicação química entre os indivíduos, além de fornecer informações importantes sobre biologia e a história evolutiva dos grupos (STROHM et al., 2007; WEISS et al., 2015; WEISS et al., 2017; SCHINDLER et al., 2018).

### **1.3 Aplicação de estudos em morfologia comparada para inferências filogenéticas**

Inúmeros pesquisadores acreditam que uma saída para elucidar os grupos de taxonomia mais conturbada seria a união categórica entre análises moleculares e morfológicas, a qual viria para melhorar a identificação das espécies coletadas (JANZEN et al., 2009). Este pensamento parte do pressuposto de que análises baseadas em dados moleculares devem ser vistas como ferramentas complementares para que especialistas possam descrever de forma mais concisa a biodiversidade existente, sem, no entanto, deixar de levar em conta as estruturas que compõem o grupo em análise. Por outro lado, alguns grupos de pesquisa consideram que a utilização exclusiva de dados moleculares pode suprir a necessidade da taxonomia tradicional, postura esta que favorece o aumento da atual crise no quadro de taxonomistas (SCOTLAND et al., 2003; AGNARSSON & KUNTNER, 2007).

Em contrapartida à massiva aplicação de dados moleculares, houve um renascimento nos estudos de morfologia e anatomia dos organismos. Embora tenha havido um declínio dessas técnicas no último século, novos métodos e abordagens teóricas surgiram e vêm dando novos impulsos a esta área de conhecimento, especialmente nos últimos dez anos (FRIEDRICH & BEUTEL, 2008; BEUTEL & KRISTENSEN, 2012; FRIEDRICH et al., 2014).

Uma das mais tradicionais técnicas em estudos morfológicos é a Histologia. Este campo possui reconhecida tradição no estudo da morfologia de insetos, mesmo apresentando dificuldades, como relatado no trabalho de Van Heerden (1945). Neste, o autor afirma que as técnicas histológicas utilizadas pela maioria dos zoólogos não são bem-sucedidas quando aplicadas ao estudo dos insetos. Por conta disso, grandes esforços têm sido conduzidos na área, e novas técnicas e equipamentos vêm fazendo com que a histologia tenha maior aplicabilidade no estudo da morfologia de insetos (FRIEDRICH & BEUTEL, 2008; BARBOSA et al., 2015). A utilização desta ferramenta é importante, pois a descrição histológica aumenta o detalhamento de estruturas, tornando possível a exploração de novos sistemas de caracteres.

Ainda que alguns trabalhos tenham lidado com aspectos particulares da morfologia interna em grupos de Crabronidae, especialmente nas subfamílias Philanthinae e Pemphredoninae, uma abordagem abrangente e comparativa que forneça informações sobre o pterostigma dos Hymenoptera ainda é incipiente. Dessa forma, este estudo visa fornecer informações adicionais a partir de uma fonte alternativa de dados morfológicos e reconhecimento de sinapomorfias que possam ser incorporadas a futuras análises dentro do grupo.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

- Realizar um estudo descritivo do pterostigma em grupos de vespas apoideas da família Crabronidae com ênfase na subtribo Stigmina.

### **2.2 Específicos**

- Descrever a estrutura e aspectos ultra-estruturais de glândulas do pterostigma presentes em gêneros de Stigmina;
- Codificar caracteres do pterostigma em gêneros da subtribo Stigmina;
- Fornecer descrições histológicas do pterostigma em grupos de Crabronidae e Apidae.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostragem taxonômica e estrutura de interesse: obtenção do material

Os espécimes utilizados para este estudo foram capturados nas dependências do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná (25.2643°S 49.1356°W) entre os meses de dezembro de 2017 a outubro de 2018. As coletas fortuitas dependiam do clima, podendo ser feitas pela manhã ou pela tarde.

A captura do material foi efetuada por meio do método de busca ativa utilizando redes entomológicas. Os espécimes foram acondicionados vivos em frascos de vidro e mantidos em recipiente térmico até a conclusão da dissecação. De acordo com o horário da dissecação, os insetos eram nutridos com solução açucarada à base de mel embebida em pedaços de papel filtro.

Para este estudo, foram utilizadas apenas as asas anteriores dos insetos coletados. Dessa forma, após a retirada da estrutura interesse, os espécimes foram alfinetados e incorporados como material testemunho com devidas etiquetas de procedência.

A fim de investigar a presença de epiderme glandular no pterostigma em outros representantes de Stigmina (Fig.1 Pemphredoninae\*), buscou-se amostrar o maior número de espécies pertencentes à esta subtribo. Para a descrição adicional do pterostigma em outras linhagens de Apoidea foram utilizados indivíduos que dispusessem de um pterostigma evidente. A amostragem taxonômica buscou abranger as principais linhagens da família Crabronidae (sensu Melo, 1999) e, adicionalmente, representantes da família Apidae (Figura 1). Para este estudo, foram amostrados 10 gêneros e 12 espécies, compreendidas em quatro subfamílias entre vespas apoideas e abelhas (Tabela I; Apêndice D).

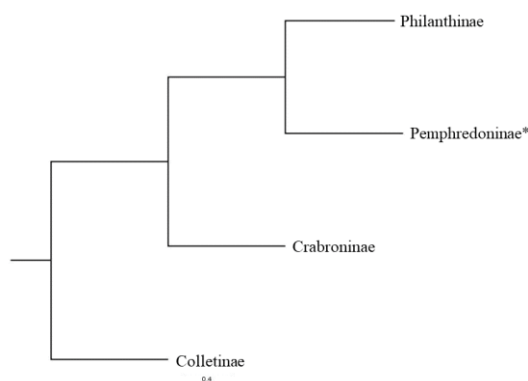


Figura 1 Esquema filogenético que resume as linhagens de Apoidea utilizadas no presente estudo. \* Subfamília na qual estão inseridos os representantes de Stigmina.

Tabela I Material utilizado para descrição do pterostigma em linhagens de Apoidea. Microscopia de Luz (ML), Microscópio Estereoscópico (ME) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

<b>Família</b>	<b>Subfamília</b>	<b>Tribo</b>	<b>Subtribo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Sexo</b>	<b>Microscopia</b>	<b>No. de exemplares</b>
Apidae	Colletinae	Xeromelissini	-	<i>Chilicola</i> sp.	M	M.L.	1
Apidae	Colletinae	Hylaeini	-	<i>Hylaeus</i> sp.	F	M.L.	1
Crabronidae	Philanthinae	Cercerini	-	<i>Cerceris</i> sp.	M	M.L.	1
Crabronidae	Crabroninae	Crabronini	Crabronina	<i>Ectemnius</i> sp.	F	M.L.	1
Crabronidae	Crabroninae	Oxybelini	-	<i>Oxybelus</i> sp.	M	M.L.	1
Crabronidae	Crabroninae	Crabronini	Crabronina	<i>Rhopalum</i> sp.	M	M.L.	1
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Spilomenina	<i>Spilomena</i> sp.	F	M.L.	1
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Stigmina	<i>Allostigmus alexanderi</i> Melo & Naumann, 1999	F	M.E./ MEV	1
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Stigmina	<i>Araucastigmus masneri</i> Finnamore, 1995	F	M.E./ MEV	1
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Stigmina	<i>Araucastigmus glabratus</i> (Kohl, 1905)	F/M	MEV	1
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Stigmina	<i>Carinostigmus flippovi</i> (Gussakovskij, 1934)	F	M.E.	1
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Stigmina	<i>Ceratostigmus tasmanicus</i> Melo & Naumann, 1999	F	M.E.	1
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Stigmina	<i>Incastigmus pycnoglypticus</i> Finnamore, 2002	F	MEV	1
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Stigmina	<i>Incastigmus ictericornis</i> Finnamore, 2002	F/M	M.L./ MEV	7
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Stigmina	<i>Incastigmus neotropicus</i> (Kohl, 1890)	M	M.L./ MEV	3
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Stigmina	<i>Llaqhastigmus mantanti</i> Finnamore, 1995	F	M.L./ MEV	4
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Stigmina	<i>Paracrabro</i> sp.	F	M.E.	1
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Stigmina	<i>Paracrabro froggatti</i> Turner, 1907	F	M.E.	1
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Stigmina	<i>Parastigmus huecuvus</i> Finnamore, 1995	F	M.E.	1

Continuação Tabela I

<b>Família</b>	<b>Subfamília</b>	<b>Tribo</b>	<b>Subtribo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Sexo</b>	<b>Microscopia</b>	<b>No. de exemplares</b>
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Stigmina	<i>Parastigmus argentinus</i> Antropov, 1992	F	M.E.	1
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Stigmina	<i>Parastigmus patagonicus</i> (Mantero, 1902)	F	M.E./ MEV	1
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Stigmina	<i>Stigmus americanus</i> Packard, 1867	F	M.E.	1
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Stigmina	<i>Stigmus quadriceps</i> Tsuneki, 1954	F	M.E.	1
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Stigmina	<i>Stigmus pendulus</i> Panzer, 1804	F	M.E.	1
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Stigmina	<i>Stigmus</i> sp.	M	M.L.	2
Crabronidae	Pemphredoninae	Pemphredonini	Stigmina	<i>Tzustigmus rhinocerus</i> (Budrys, 1987)	F	M.E.	1

## **3.2 Estudo histológico: Microscopia de luz (ML) e Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

### **3.2.1 Fixação e inclusão em resina**

Os indivíduos vivos foram dissecados em placa de Petri contendo solução fixadora. As asas anteriores de cada indivíduo (direita e esquerda) foram recortadas na base com auxílio de microtesouras. Para maior penetração da solução fixadora, era feita uma pequena incisão próxima ao pterostigma. Posteriormente, as asas inteiras dissecadas eram colocadas em microtubos individuais contendo uma mistura de: Glutaraldeído 2,5%, Paraformaldeído 1%, Sacarose 1,5% e tampão Cacodilato 0,1M (modificado de KARNOVSKY, 1965). As amostras foram lavadas em tampão Cacodilato 0,1M e posteriormente pós-fixadas em Tetróxido de Ósmio 2% e novamente lavadas em solução tampão.

Para inclusão em resina, as asas foram desidratadas em duas etapas: uma série gradual crescente de etanol e uma segunda desidratação em Óxido de Propileno (OP). As amostras foram gradualmente embebidas em resina Poly/ Bed® 812 incluindo quatro etapas de pré-emblocagem: OP/ resina 2:1 (6h), 1:1 (*overnight*), 1:3 (6h) e resina pura (*overnight*) (adaptado de GAINETT et al., 2017). Ao fim do procedimento de inclusão, o material foi levado para estufa em um molde de silicone com devidas etiquetas de procedência, permanecendo a 60°C durante 48 horas.

Informações sobre formulações da solução fixadora e tampão, bem como duração das etapas de inclusão estão disponíveis em protocolo nos Apêndices A e B.

### **3.2.2 Microtomia e registro de imagens**

#### **3.2.2.1 Cortes semifinos**

Para obtenção de cortes semifinos, foram confeccionadas navalhas de vidro com auxílio do equipamento KnifeMaker Leica. Em um ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT), foram obtidos cortes longitudinais com 1,5 $\mu$  de espessura, dispostos sequencialmente em uma lâmina de vidro. Posteriormente, os cortes foram corados (~ 2-5 segundos) em azul de Toluidina 1%. Após a coloração, os cortes foram protegidos pela cobertura de lamínulas de vidro, ligadas às lâminas através de uma substância selante (Entellan®).

As lâminas permanentes foram analisadas em microscópio Olympus BX-51 disponível no Taxonline e fotografadas em equipamento do mesmo modelo disponível

no Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF), do Setor de Ciências Biológicas, UFPR. As lâminas foram visualizadas em campo claro e as imagens foram obtidas a partir da câmera acoplada ao microscópio e capturadas utilizando o programa Cell F- Multi-fluorescence and Imaging Software (Matrix Optics 2009).

### **3.2.2.2 Cortes ultrafinos**

Os cortes ultrafinos foram efetuados com auxílio de navalha de diamante Diatome, utilizando o ultramicrotomo supracitado. A espessura dos cortes variou de 50 a 70 nm e os mesmos foram dispostos em micro telas de cobre com fundo hexagonal contendo 200 *meshs*. A contrastação dos cortes foi efetuada em primeira etapa por imersão em acetato de uranila (3%) por 3 minutos, passando por 5 lavagens sucessivas em água destilada, protegidos da luz.

Após o procedimento, os cortes foram imersos em solução de Reynolds (citrato de chumbo) por 5 minutos em atmosfera pobre em CO<sub>2</sub> utilizando NaOH e posteriormente novamente lavados em água destilada. As imagens foram obtidas a partir do microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM 1200EX-11) operado a 80kV, disponível no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (CME). O registro das imagens foi realizado a partir da câmera CCD Gatan (BioScan) acoplada ao microscópio.

## **3.3 Morfologia comparada: codificação de caracteres em Stigmina**

A fim de reconhecer características informativas do ponto de vista filogenético a partir da morfologia externa do pterostigma dos Stigmina, os caracteres foram codificados a partir de indivíduos pertencentes a oito dos 11 gêneros descritos para o grupo (Tabela I). Os insetos foram analisados sob microscópio estereoscópico LEICAM125, equipado com ocular de 10x e micrométrica. Todas as espécies analisadas estão depositadas na Coleção Entomológica Pe. Jesus Santiago Moure da Universidade Federal do Paraná.

## **3.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Asas dos gêneros *Incastigmus* e *Llaqhastigmus* foram recortadas desde a base utilizando micro tesouras e depois limpas com auxílio de pincel de cerdas em três banhos de álcool 80%. Posteriormente, as amostras foram desidratadas através do ponto crítico com CO<sub>2</sub> líquido (Batltéc- CPD 030), após prévia desidratação em série

alcoólica. Em seguida, as amostras foram montadas em *stubs* com fita dupla face de carbono e revestidas com ouro por pulverização em metalizadora Baltec- SCD 050.

Para indivíduos raros pertencentes aos gêneros *Allostigmus*, *Araucastigmus* e *Parastigmus*, os espécimes alfinetados foram montados em *stub* e a visualização efetuada a baixo vácuo, sem metalização. As fotografias foram obtidas com o microscópio Jeol- JSM- 6360LV disponível no CME.

### 3.5 Vetorização e análise dos dados

A edição das imagens e confecção das pranchas foi efetuada a partir da utilização dos *softwares* Adobe Photoshop CS6 e CorelDraw X5, respectivamente. A caracterização histológica foi feita a partir de observações de características teciduais como: formato, comprimento, largura e posição das células, comparação entre os tecidos, assim como outras características que se mostraram importantes para caracterização das linhagens de Apoidea.

Para descrição detalhada do pterostigma da subtribo Stigmina, a espécie *Stigmus* sp. foi escolhida como um modelo de descrição sequencial da estrutura. A razão da escolha deveu-se aos melhores resultados de inclusão e microtomia. Todo o pterostigma foi seccionado em cerca de 300 cortes semifinos transversais, mas apenas 8 regiões informativas (da base ao ápice do pterostigma) foram selecionadas (Fig. 2).

Além das espécies de Stigmina, os cortes histológicos realizados nos gêneros das famílias Crabronidae e Apidae foram representados em cortes transversais do pterostigma em 4 pontos igualmente localizados de forma comparativa (Fig. 3). Aqui, utilizamos a técnica de cortes semifinos para fornecer uma descrição das características morfológicas do pterostigma destes insetos.

Para orientação dos cortes histológicos, foram confeccionadas rosas dos ventos com indicações das regiões de corte do pterostigma: D= dorsal; V= ventral; A= Anterior; P= posterior (Fig 2). As imagens em que não há a identificação com a rosa dos ventos significa que a orientação segue a da foto anterior identificada.



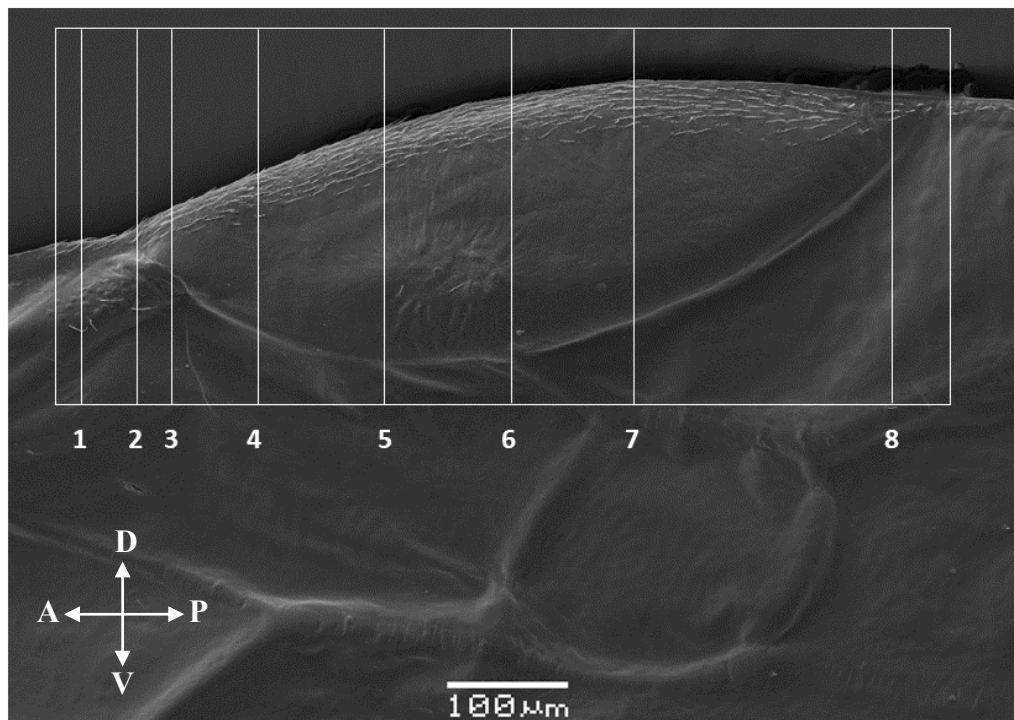


Figura 2 Eletromicrografia (Microscopia Eletrônica de Varredura) mostrando a asa anterior de *Incastigmus neotropicus* (Kohl, 1890), ilustrando as oito regiões de cortes transversais efetuados no pterostigma. Escala: 100μm

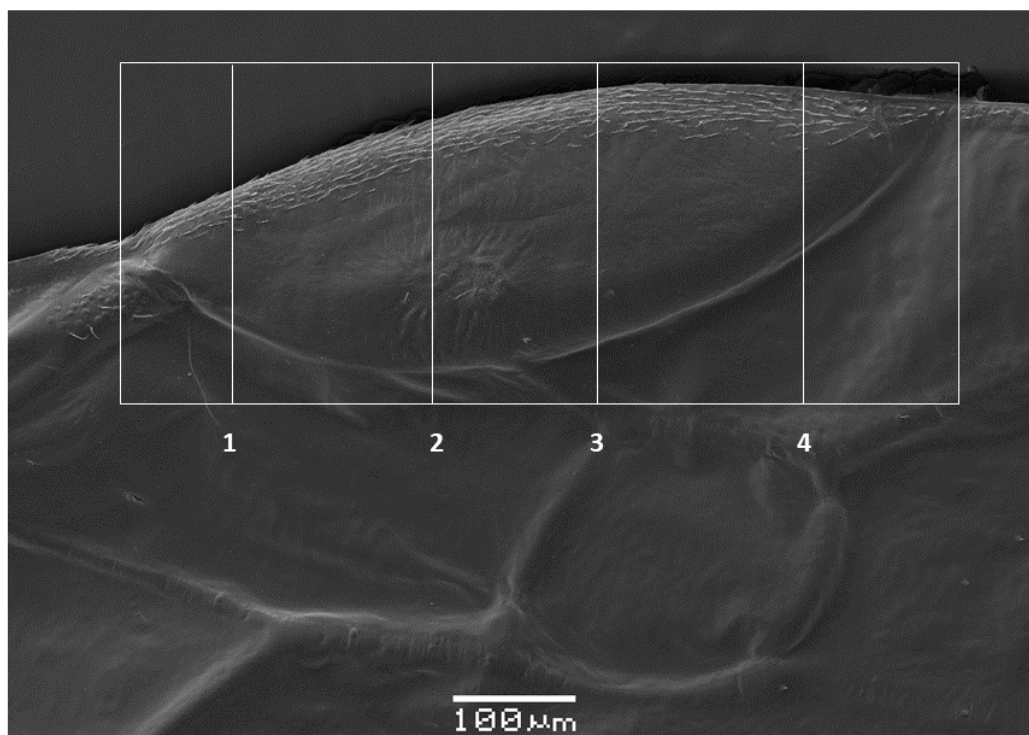


Figura 3 Eletromicrografia (Microscopia Eletrônica de Varredura) da asa anterior de *Incastigmus neotropicus* (Kohl, 1890), indicando as quatro regiões de cortes transversais efetuados no pterostigma.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Descrição estrutural e aspectos ultra-estruturais do pterostigma em espécies de *Stigmina*

- O pterostigma de *Stigma* sp.

Nas regiões 1 e 2, ainda no pterostigma, os cortes revelam constituintes de veias comuns. Interior revestido por epiderme, presença de traqueia, nervos e o espaço pelo qual flui a hemolinfa (Fig. 4 A–C).

A região 3, já no pterostigma propriamente dito, notam-se além dos constituintes citados na região 1 e 2, grânulos de pigmento agrupados associados ao tecido de preenchimento (Fig. 4 D–G). Este tecido vai se expandindo até alcançar o epitélio (Fig. 4 E–G). O epitélio internamente reveste todo o pterostigma com células com núcleo achatado (Fig. 8 A–B).

Desde o início da região 4 já há indícios da glândula do pterostigma (Fig. 5 A–B). A primeira porção glandular está localizada na região ventral da parte basal do pterostigma. As regiões apicais das células glandulares podem ser vistas nos primeiros cortes, até o ponto da abertura em um campo de microporos (CM) côncavo no qual as células secretoras estão ligadas (Fig. 5 C). Na região mediana e apical, há o tecido de preenchimento que conecta a superfície dorsal e ventral por meio de ramificações com grande quantidade celular. Além disso, os grânulos agrupados continuam associados a este tecido, mas também podem ser vistos em regiões periféricas da cavidade (Fig. 5 C–D, Fig. 6 A).

A região 5 mostra a interseção das glândulas nas superfícies dorsal e ventral (Fig. 5 E–F). Neste ponto, as células da glândula ventral começam a desaparecer e o espaço vai sendo preenchido pela glândula dorsal. Assim como na primeira porção glandular, as glândulas dorsais também apresentam desembocadura em um CM situado na superfície dorsal (Fig. 6 B–E). Na região 6 a glândula dorsal ainda aparece nos últimos cortes na porção basal (Fig. 6 D–E), na porção apical nada muda desde a região 4.

Na região 7 quase todo pterostigma é ocupado pelo tecido de preenchimento com ramificações dorsais e ventrais que se conectam em alguns pontos. Na base das ramificações ocasionalmente pode haver células dispersas com núcleo evidente (Fig. 7 A–D).

Por fim, na porção 8, já não há presença do tecido de sustentação ligando as porções dorsal e ventral, mas sim deslocado para a região dorsal do pterostigma como

uma camada adicional de revestimento. Ligados ao tecido estão os pigmentos, agora em menor quantidade, e um maior espaço para passagem de hemolinfa (Fig. 7 E–F).

- **Glândulas exócrinas no pterostigma**

Ainda com base nas lâminas de *Stigmus* sp., são descritos os componentes principais observados nas glândulas do pterostigma.

Os campos de microporos externos nas regiões dorsal e ventral são ligados a numerosas células glandulares que, em corte transversal, são visíveis como um complexo em forma de C sob a cutícula. A porção principal do sistema glandular parece ser esferoidal, composta de uma monocamada de células secretoras justapostas. As células são ligadas ao campo de microporos por uma região basal mais estreita quando comparada ao citoplasma glandular (Fig. 6 B). A região apical das células são levemente acinosas. Os agrupamentos de células secretoras são formados por aproximadamente 18 células na região dorsal e 8 células na região ventral. As células glandulares parecem ser do mesmo tipo celular devido à posição semelhante dos núcleos. O núcleo é bem desenvolvido, circular, rico em cromatina, não possuindo nucléolo muito evidente, localizado sempre apicalmente. O citoplasma das células glandulares é granular com presença abundante de pequenas estruturas de aspecto vazio que sugerem acúmulo de lipídeos (Figs. 5 C e 6 B).

O pterostigma apresenta cutícula muito mais espessa quando comparado ao restante da membrana alar e veias adjacentes, contando com uma estrutura em multicamadas e porosa (Fig. 8 C–D). Uma característica interessante a ressaltar é a modificação da cutícula em relação à desembocadura da glândula. No CM dorsal nota-se medialmente a presença de estruturas semelhantes a sensores campaniformes (Figs. 14, 15 e 16). A partir do corte histológico é possível observar uma abertura nesta região em que parecem desprender-se para o meio externo em um tipo de secreção holócrina (Fig. 6 D–E), sendo esta característica observada em todas as espécies de *Stigmina* aqui analisadas (Figs. 10 E; 12 C).

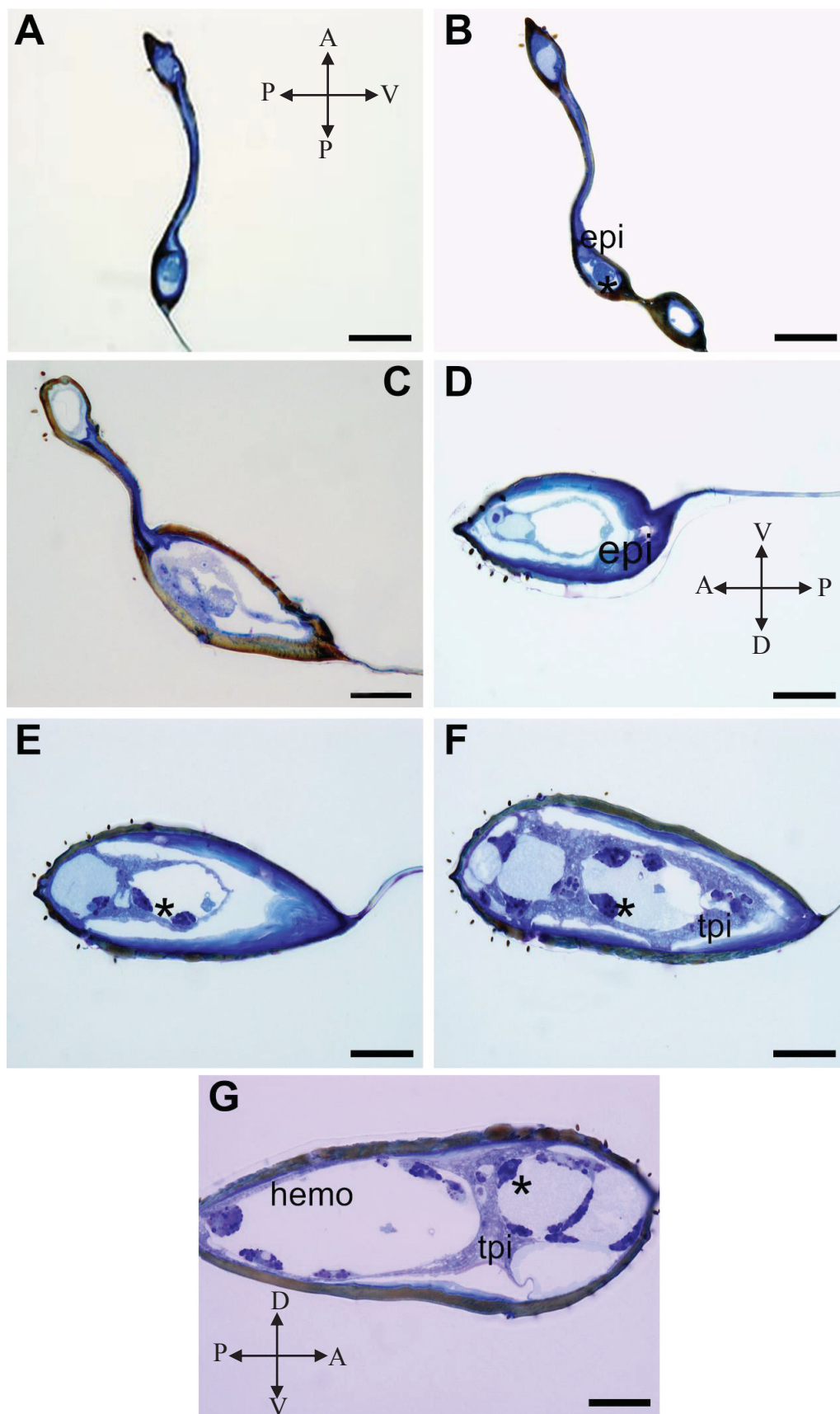


Figura 4 Cortes semifinos do pterostigma de *Stigmus* sp. Regiões 1 (A–B) e 2 (C) Cortes transversais do prestigma: (epi) epiderme, (\*) nervos; Região 3 (D–G) pterostigma: (tpi) Tecido de preenchimento intermediário, (\*) grânulos de pigmento, (hemo) espaço de pass



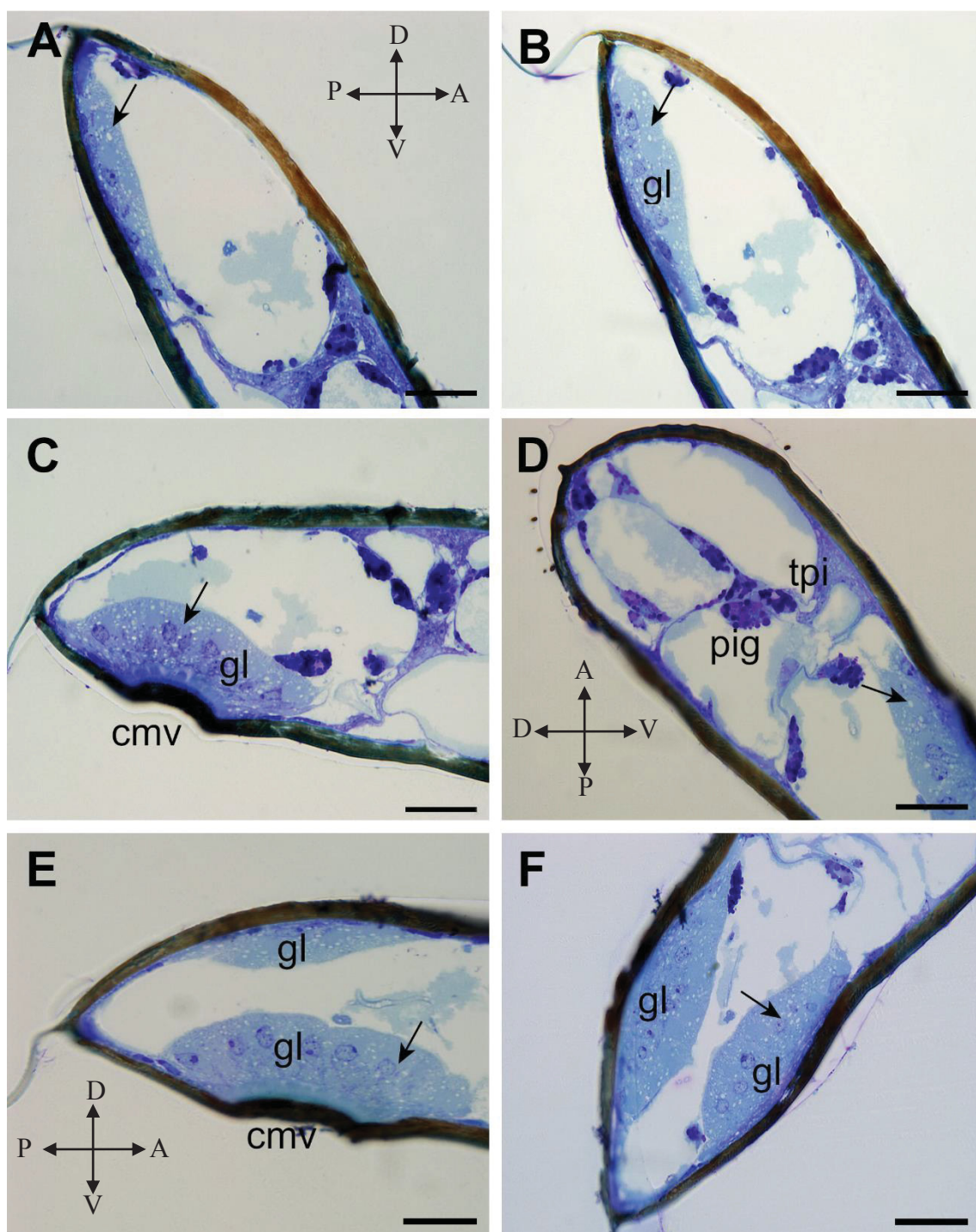


Figura 5 Cortes semifinos do pterostigma de *Stigmus* sp. Região 4 (A–D): (A e B) (gl) células secretoras; (C) (cmv) (gl) células secretoras ligadas ao campo de microporos ventral (cmv), (seta) gotículas de lipídeo; (D) (pig) grânulos de pigmento, (tpi) tecido de preenchimento intermediário. Região 5 (E e F) interseção de glândulas dorsal e ventral. Escala: 20µm

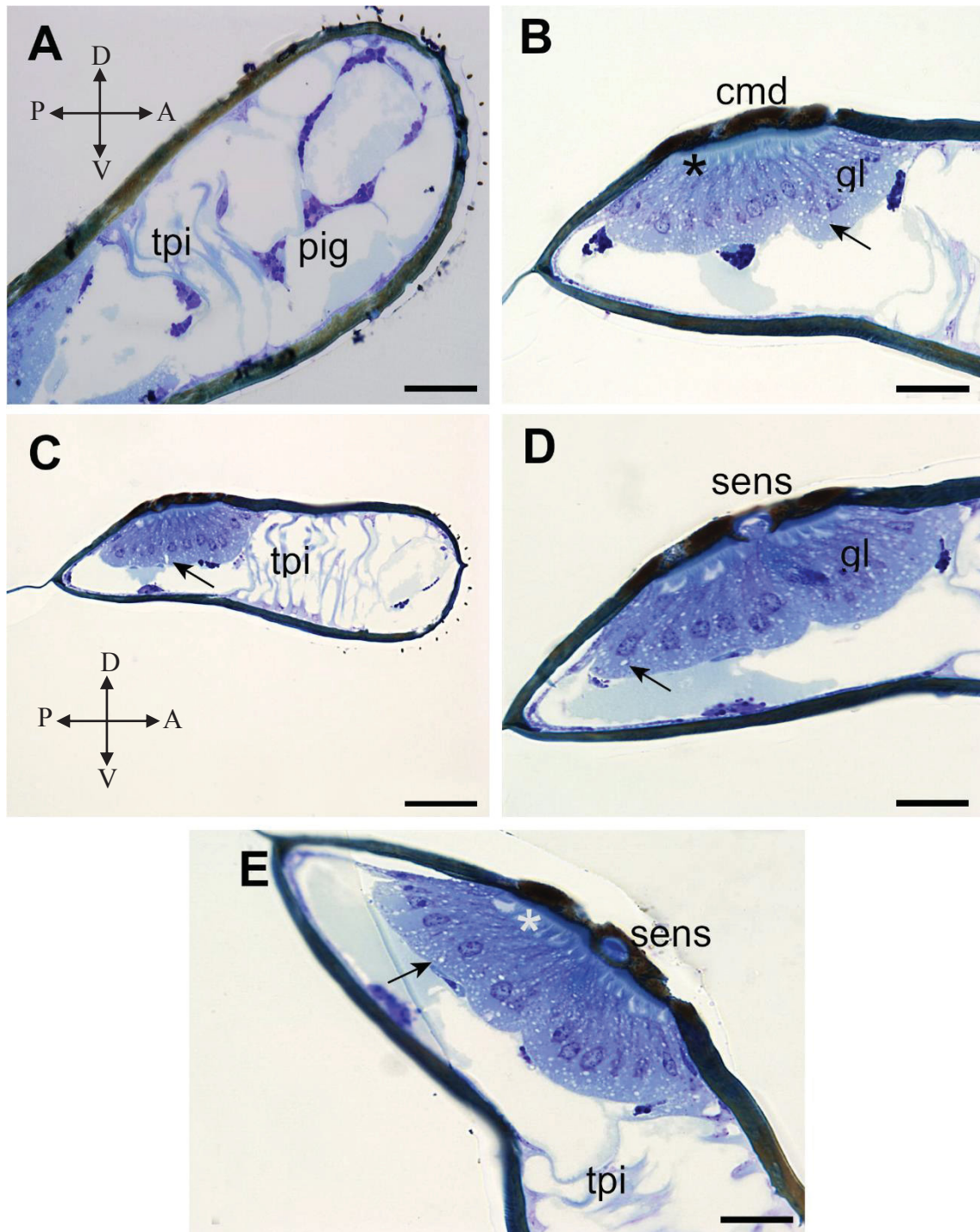


Figura 6 Cortes semifinos do pterostigma de *Stigmus* sp. Regiões 5 e 6 (A– E): (A) (pig) grânulos de pigmento; (tpi) tecido de preenchimento intermediário; (B–E) (gl) epiderme glandular ligada ao campo de microporos dorsal (cmd), (B) (\*) região basal celular estreita, (seta) gotículas de lipídeo; (D e E) (sens) ligação ao sensor externa. Escalas: Figs. A, B, D e E: 20µm; Fig. C: 50µm



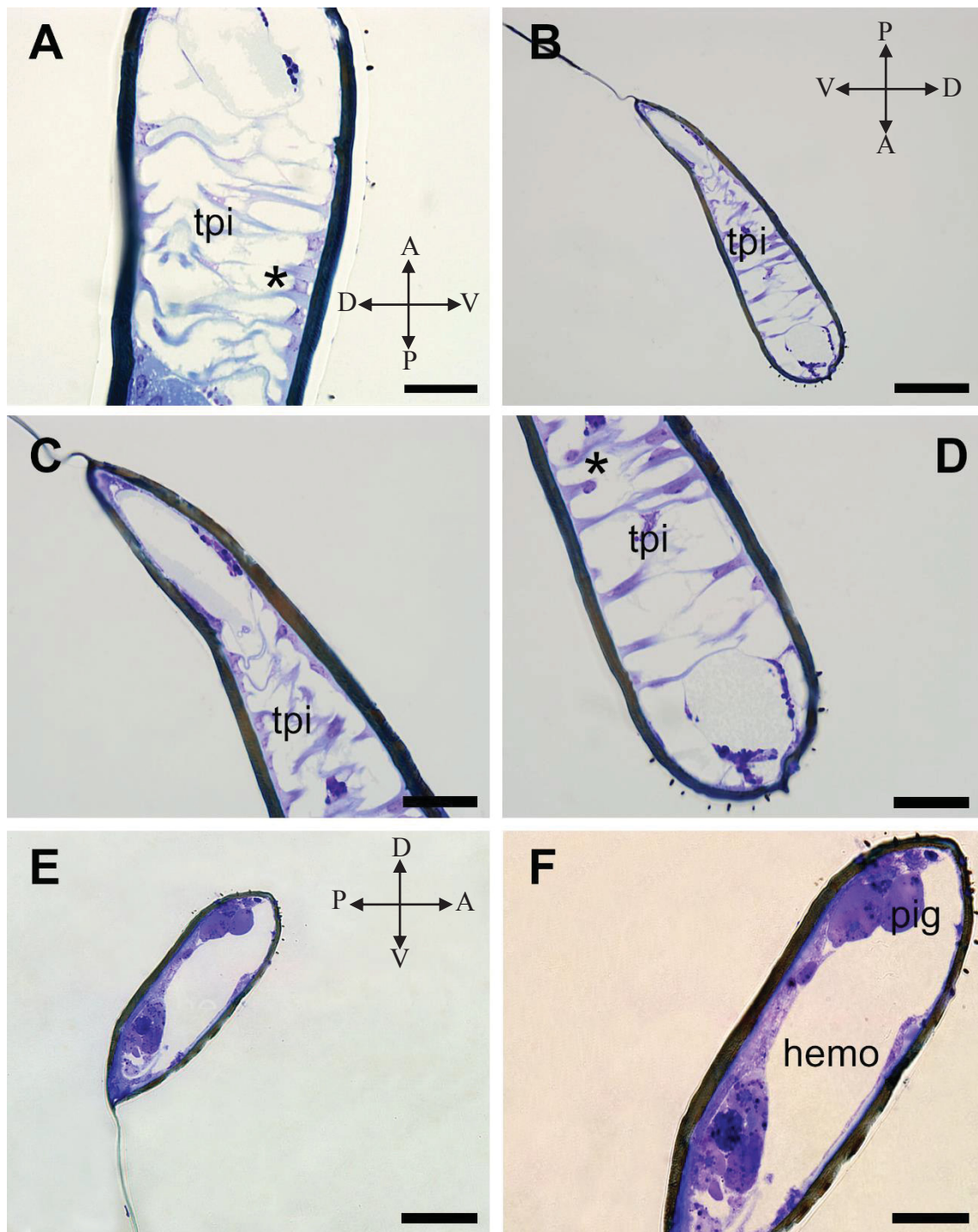


Figura 7 Cortes semifinos do pterostigma de *Stigmus* sp. Região 7 (A– D): (tpi) tecido de preenchimento intermediário, (\*) células associadas à base. Região 8 (E e F) (pig) grânulos de pigmento, (tpi) tecido de preenchimento intermediário, (hemo) espaço de passagem de hemolinfa. Escalas: Figs. A, C, D e F: 20µm; B, C e E: 50µm

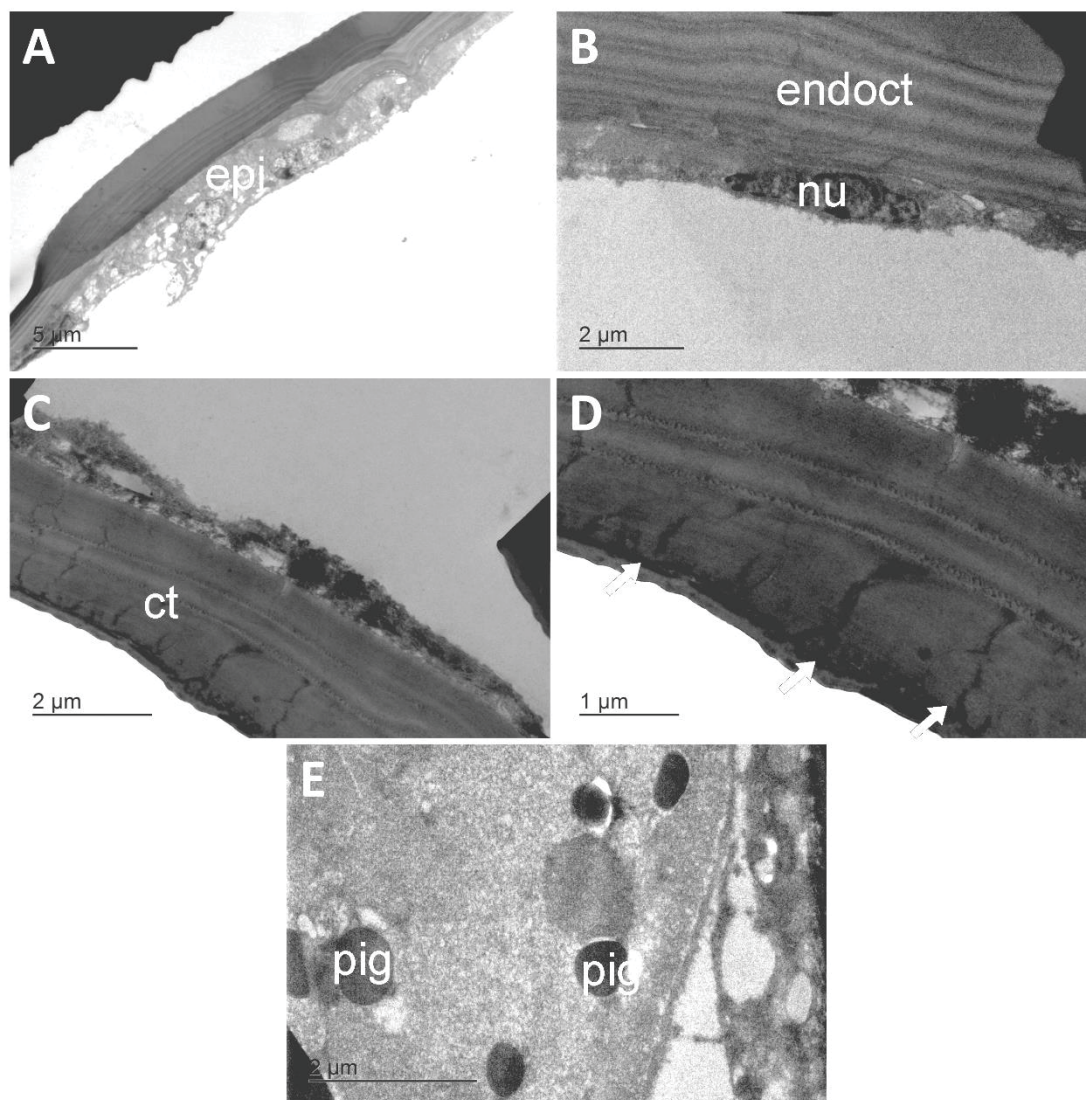


Figura 8 Eletromicrografia (Microscopia Eletrônica de Transmissão) do pterostigma de *Stigmus* sp. (A– E): (A) (epi)epiderme, células dispersas; (B) (endocut) endocutícula, (nu) núcleo celular achatado; (C e D) (setas) microporos na cutícula; (E) (pig) grânulos de pimento. Escalas: Fig. A: 5μm; Figs. B, C e E: 2 μm; Fig. D: 1μm

#### • Descrição comparativa entre as espécies de *Stigmina*

Para a subtribo, machos e fêmeas de todas as espécies aqui analisadas compartilham características gerais ligadas à morfologia interna do pterostigma: (i) glândulas exócrinas nas porções dorsal e ventral do pterostigma; (ii) sistema glandular formado por uma monocamada de epitélio, cujas células apresentam estruturas semelhantes e desembocam em um campo de microporos visível em morfologia externa; (iii) tecido intermediário de preenchimento que liga as regiões dorsal e ventral; (iv) células associadas à base do tecido de preenchimento; (v) grânulos de pigmento



agrupados. Devido à descrição prévia do sistema modelo em *Stigmus* sp., aqui serão caracterizadas as diferenças encontradas nas outras três espécies amostradas.

*Incastigmus ictericornis* Finnamore, 2002 foi a espécie mais abundante na área de coleta. Contudo, foi a espécie que mais apresentou problemas em preservação, emblocagem e seccionamento. Embora as imagens possam garantir que há glândulas nas duas superfícies, os artefatos foram inevitáveis em todos os indivíduos seccionados (Fig. 9 A e B). Pouco pôde ser inferido sobre número de células nos sistemas glandulares, assim como a morfologia exata das mesmas. No entanto, nota-se que as células apresentam íntima ligação com o campo de microporos e citoplasma com estruturas lipídicas (Fig. 9 D). O pterostigma de *I. ictericornis* é mais estreito quando comparado à espécie modelo. Os reforços intermediários nesses indivíduos encontram-se aglomerados e não é possível distinguir se são ramificados ou não (Fig. 9 C).

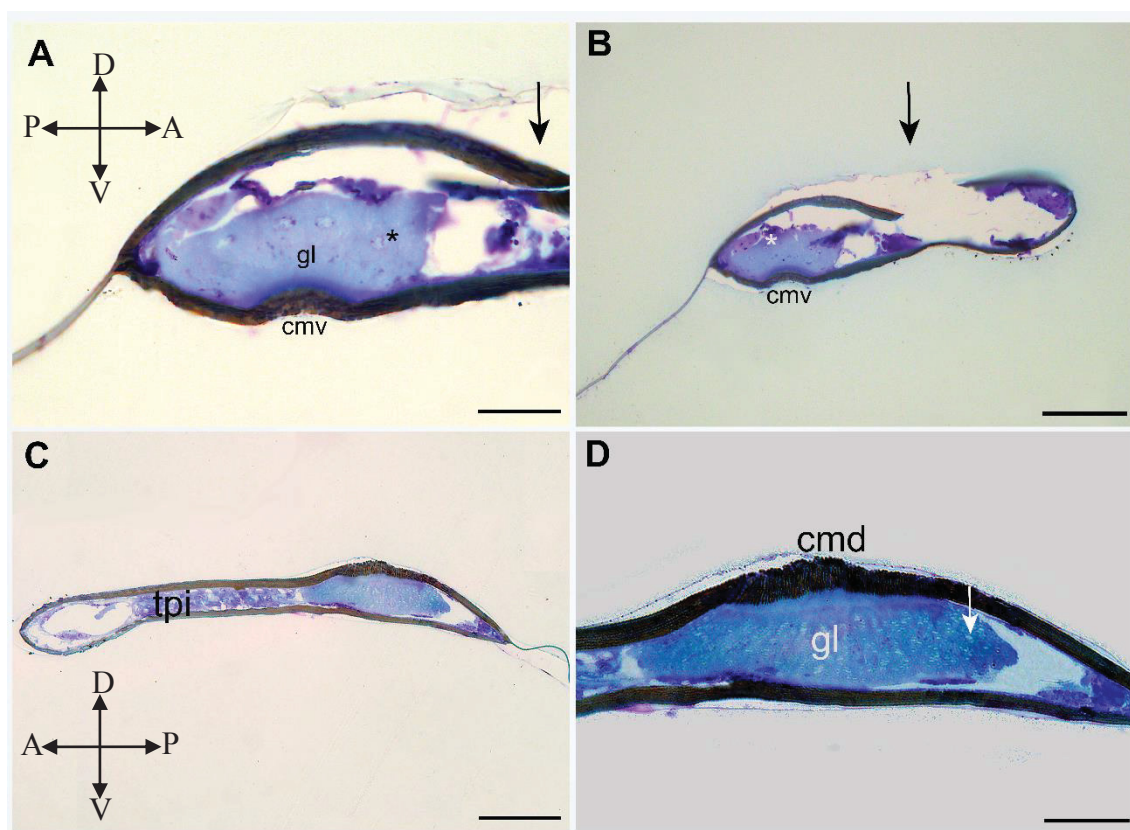


Figura 9 Cortes semifinos do pterostigma de *Incastigmus ictericornis* (A– D): (A e B) (seta) quebras de cutículas, (gl) células secretoras ligadas ao campo de microporos ventral (cmv), (\*) núcleo; (C e D) (tpi) tecido de preenchimento intermediário, (gl) células secretoras epiderme glandular ligadas ao campo de microporos dorsal (cmd), (seta) gotículas de lipídeo. Escalas: Figs. A e D: 20  $\mu$ m, Figs. B e C: 50  $\mu$ m

*Incastigmus neotropicus* (Kohl, 1890), por ser do mesmo gênero, compartilha as particularidades encontradas em *I. ictericornis*. O pterostigma é estreito, com reforços intermediários aglomerados e células esféricas dispersas associadas à base do tecido (Fig. 11 A–E). Aqui, as células glandulares encontram-se com delimitação visível, no entanto, diferente de *Stigmus* sp., as dessa espécie tem um aspecto plasmolisado (Fig. 10 D). Os núcleos também são evidentes, circulares e localizados apicalmente (Fig. 10 B). No citoplasma, as estruturas lipídicas não são tão evidentes, sendo perceptíveis apenas em maiores aumentos.

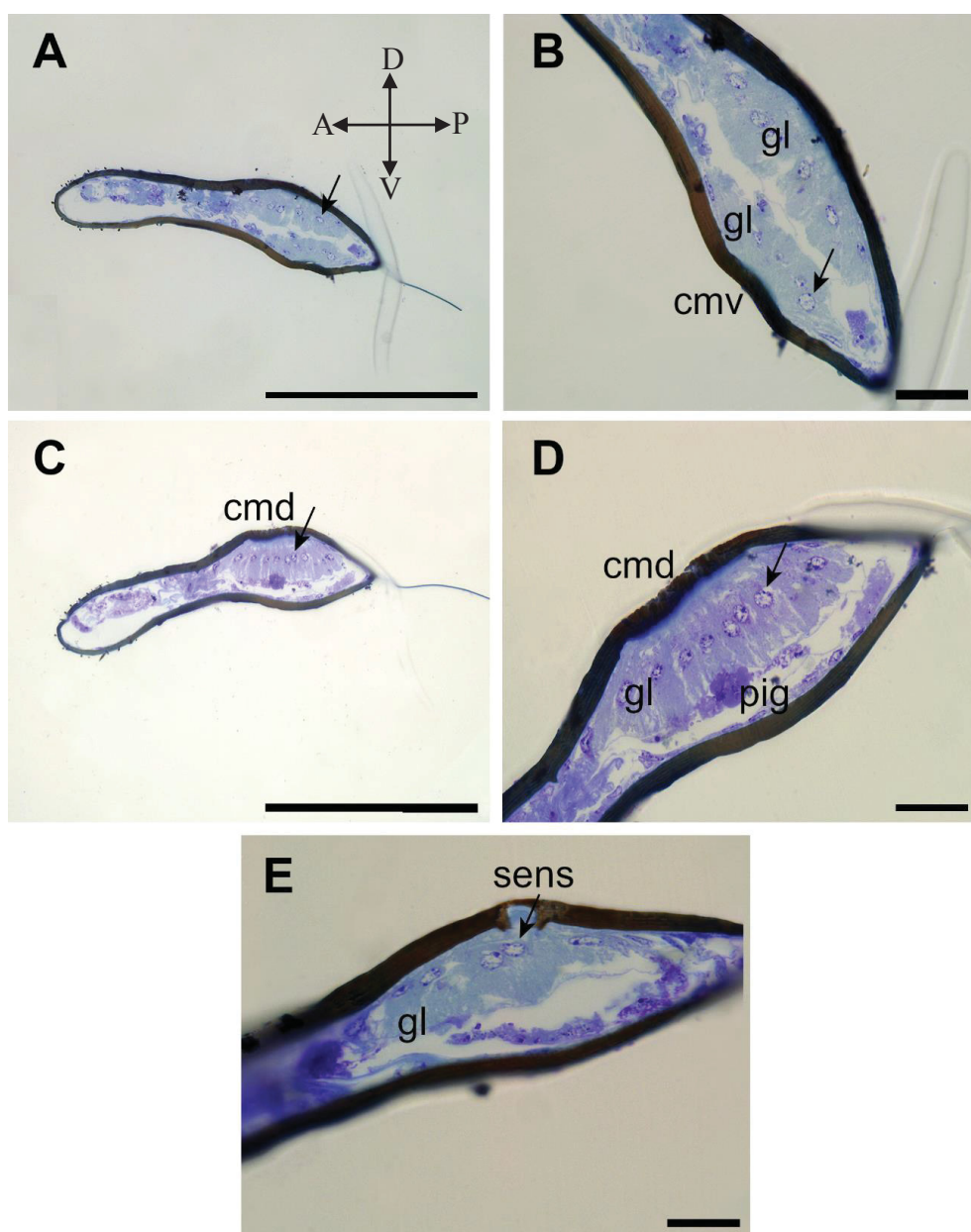


Figura 10 Cortes semifinos do pterostigma de *Incastigmus neotropicus* (A– E): (A–D) (gl) células secretoras; (seta) núcleo; (pig) grânulos de pigmento; (E) (sens) ligação ao sensor externa. Escalas: Figs. A e C: 50  $\mu$ m, Figs. B, D e E: 20  $\mu$ m

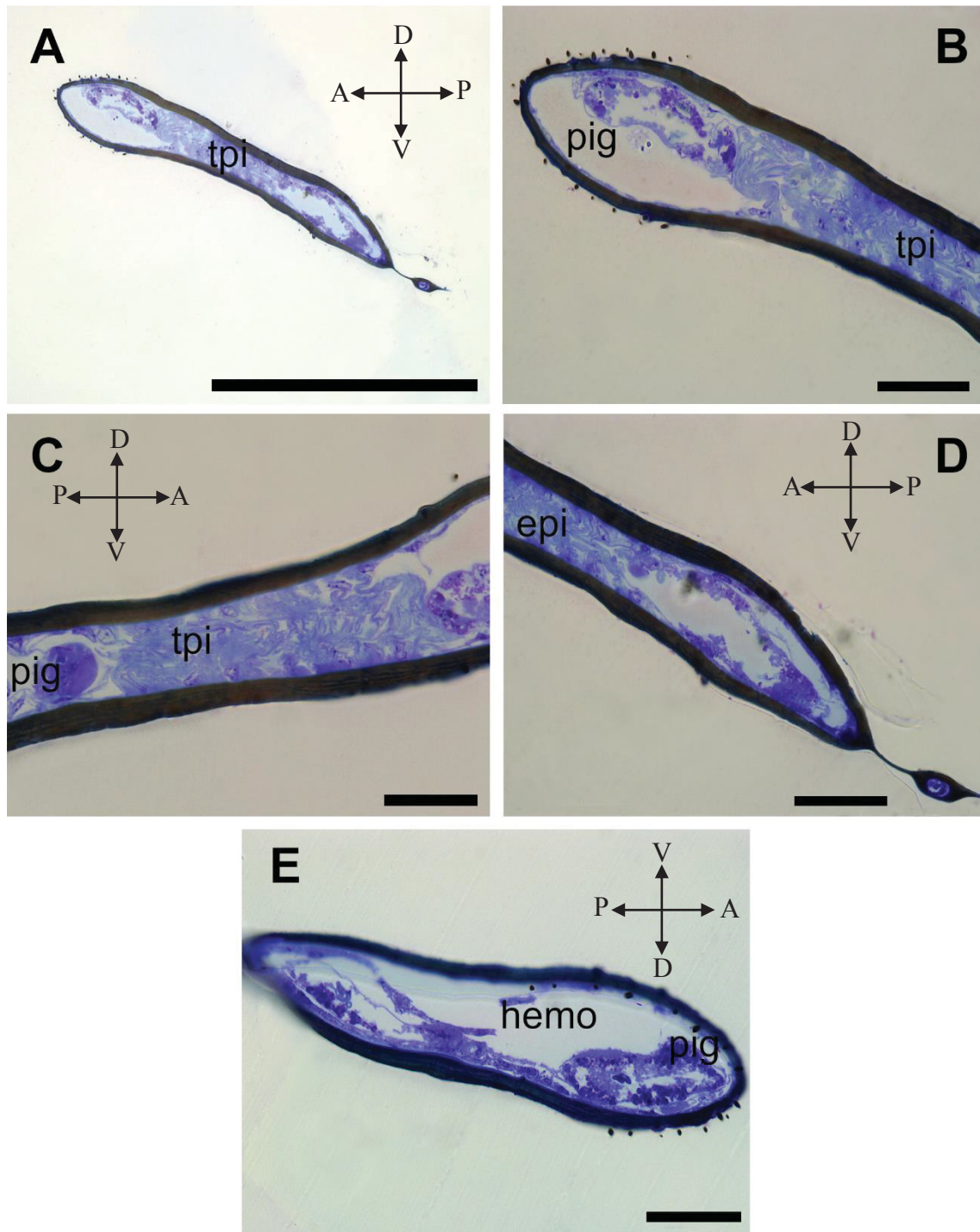


Figura 11 Cortes semifinos do pterostigma de *Incastigmus neotropicus* (A– E): (tpi) tecido de preenchimento intermediário, (pig) grânulos de pigmento, (hemo) espaço para passagem de hemolinfa. Escalas: Fig. A: 50  $\mu$ m, Figs. B –E: 20  $\mu$ m



Por fim, em *Llaqhastigmus mantanti* Finnamore, 2002, há uma organização estrutural muito semelhante ao relatado em *Stigmus*. O pterostigma mais amplo, com maior número de grânulos de pigmentos e células secretoras bastante desenvolvidas (Fig. 12 A–F). No entanto, os reforços intermediários diferem em abundância. Aqui, estes reforços com aspecto de trabéculas estão ligados medianamente ao longo de toda a cavidade (Fig. 12 A–D).

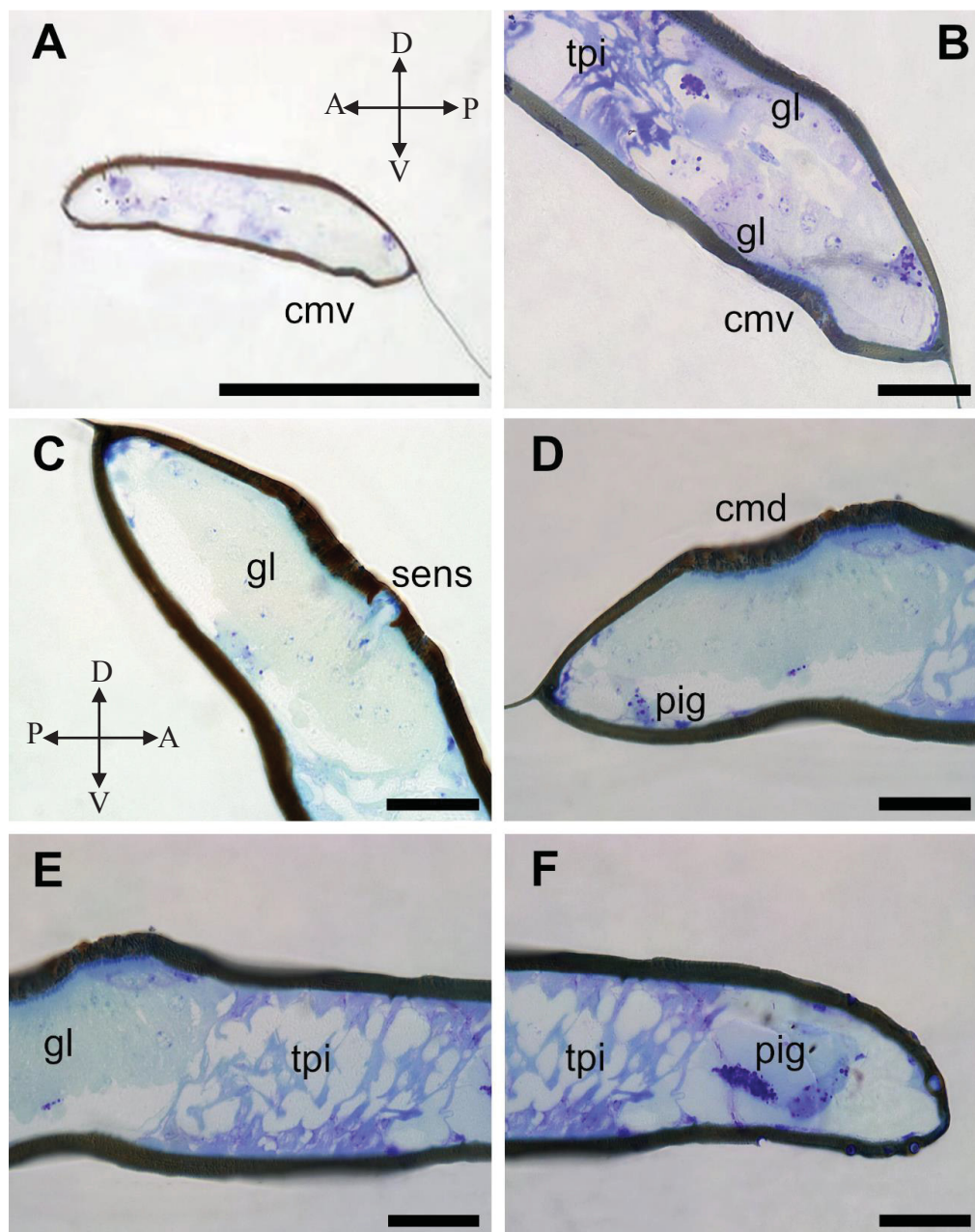


Figura 12 Cortes semifinos do pterostigma de *Llaqhastigmus mantanti* (A–F) (gl) células secretoras em campo de microporos dorsal (cmd) e ventral (cmv), (tpi) tecido de preenchimento intermediário, (sens) ligação ao sensor externo, (pig) grânulos de pigmento. Escala: Fig. A: 50µm; Figs. B–F: 20µm

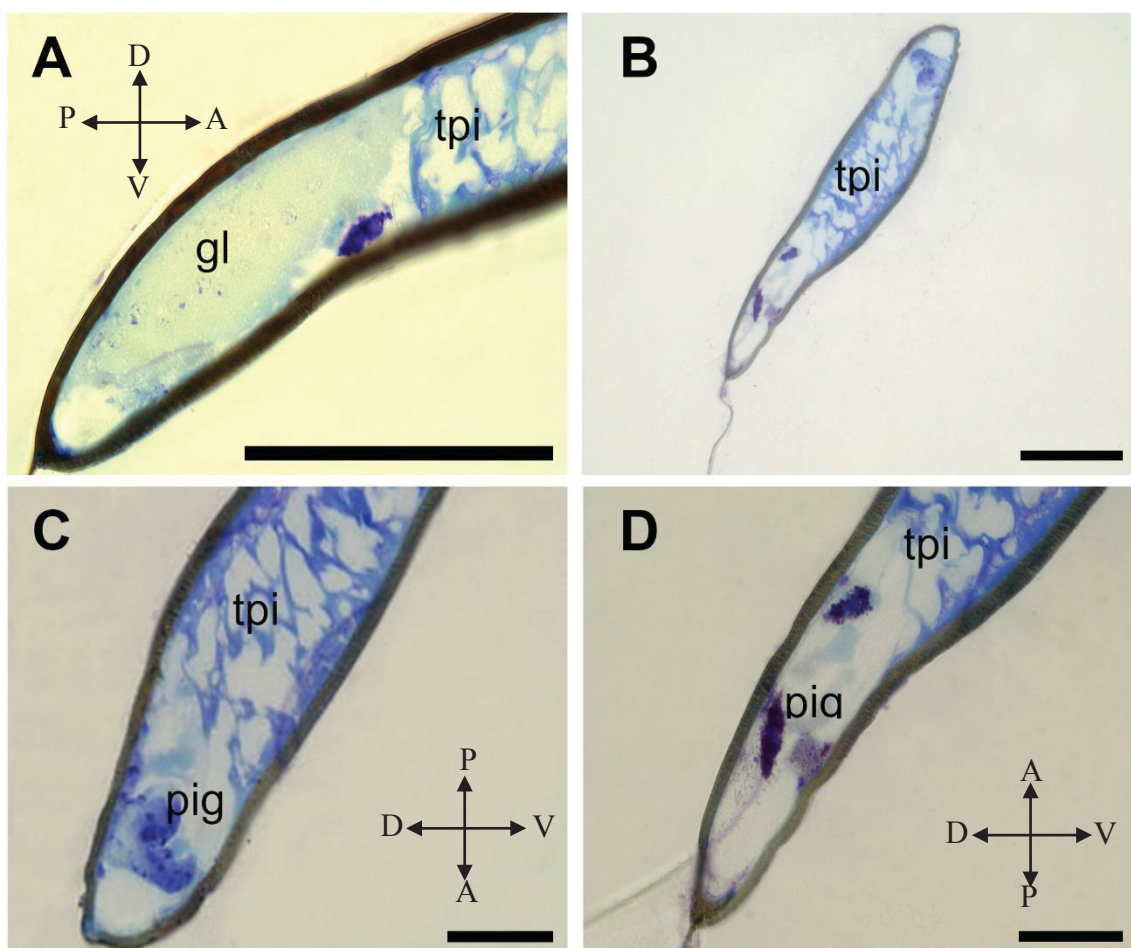


Figura 13 Cortes semifinos do pterostigma de *Llaqhastigmus mantanti*: (A–D) (gl) células secretoras, (tpi) tecido de preenchimento intermediário (tpi), (pig) grânulos de pigmento. Escalas: Figs: A, C e D: 20µm; Fig. B: 50 µm

#### 4.1.2 Morfologia externa do pterostigma de espécies de Stigmina

As espécies *Incastigmus pycnoglypticus* Finnamore, 2002, *Incastigmus neotropicus* e *Llaqhastigmus mantanti* foram utilizadas para análise da morfologia externa utilizando MEV. Características gerais foram identificadas como sendo compartilhadas pelas três espécies: (i) presença de campo de microporos delimitado nas regiões dorsal e ventral; (ii) presença de cerdas (2 a 3) espaçadas sobre o CM; (iii) presença de estruturas semelhantes a sensores com número e morfologia variável; e (iv) pré-stigma com grânulos semelhantes a sensores.

Em *I. pycnoglypticus* na região dorsal do pterostigma, observa-se um CM distinto das outras duas espécies analisadas. Os microporos não são evidentes em maiores aumentos e encontram-se circundados por regiões rugosas (Fig. 14 A–C). Medialmente, encontram-se estruturas que se assemelham a sensores campaniformes

(Fig. 14 C). Sobre o CM encontram-se 3 cerdas localizadas espaçadamente. Outras quatro cerdas estão localizadas em regiões adjacentes ao campo. Em vista ventral, o pterostigma é caracterizado por uma depressão e CM pouco evidentes, seus indícios são notados apenas em maiores aumentos (Fig. 14 F).

Em *I. neotropicus* a região dorsal do pterostigma conta com uma região de CM com aspecto liso e microporos bastante evidentes (Fig.15 A–C). Esta espécie apresenta dois sensores campaniformes com morfologia distinta da acima citada (Fig.15 B). Apenas duas cerdas são encontradas sobre o CM e não são notadas cerdas adicionais nas regiões adjacentes. Na região ventral, o CM caracteriza-se por uma região em depressão com esculturação distinta do tegumento adjacente. O diâmetro dos poros é bastante semelhante aos encontrados em vista dorsal (Fig.15 D–F).

Em *L. mantanti* a organização do pterostigma é muito semelhante ao relatado para *I. neotropicus*. A superfície em vista dorsal é lisa, com CM e bem delimitado (Fig.16 A–C). Observam-se dois sensores com morfologia diferente das encontradas no gênero *Incastigmus* (Fig.15 C). Sobre o campo de microporos são encontradas duas cerdas longas. Nas regiões adjacentes ao CM são encontradas seis cerdas adicionais. Em vista ventral, o CM também é distinto e sobre ele aparece uma camada de material com aspecto ceroso. Difícil indicar se esta camada faz parte da secreção das células glandulares (Fig.16 D–F).



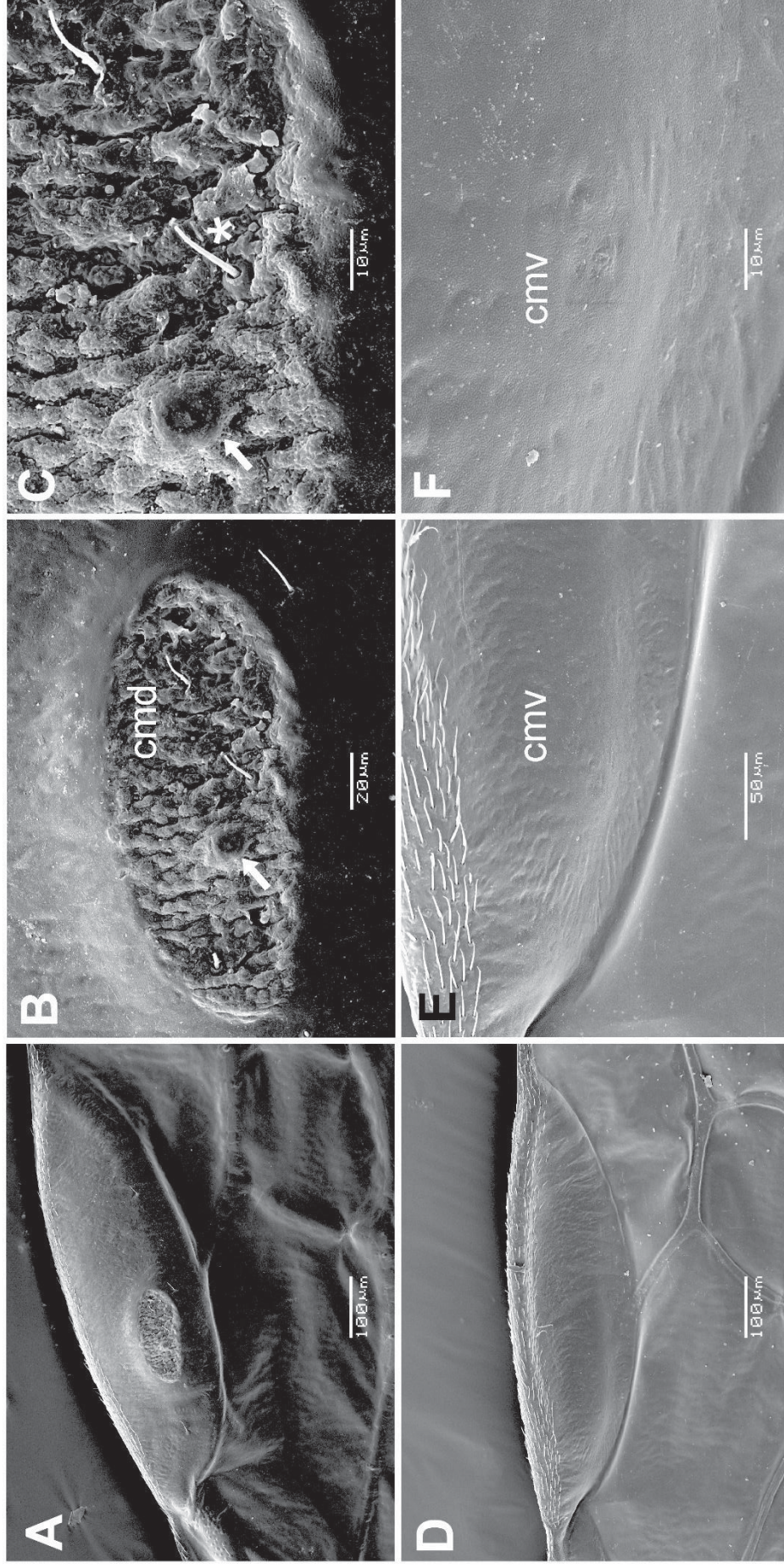


Figura 14 Eletromicrografia (Microscopia Eletrônica de Varredura) do pterostigma de *Incastignus pycnoglypticus*: (A–C) (cmd) campo de microporos dorsal, (\*) cerdas sobre o pterostigma, (seta) sensores campaniformes. (D–F) (cmv) campo de microporos ventral.



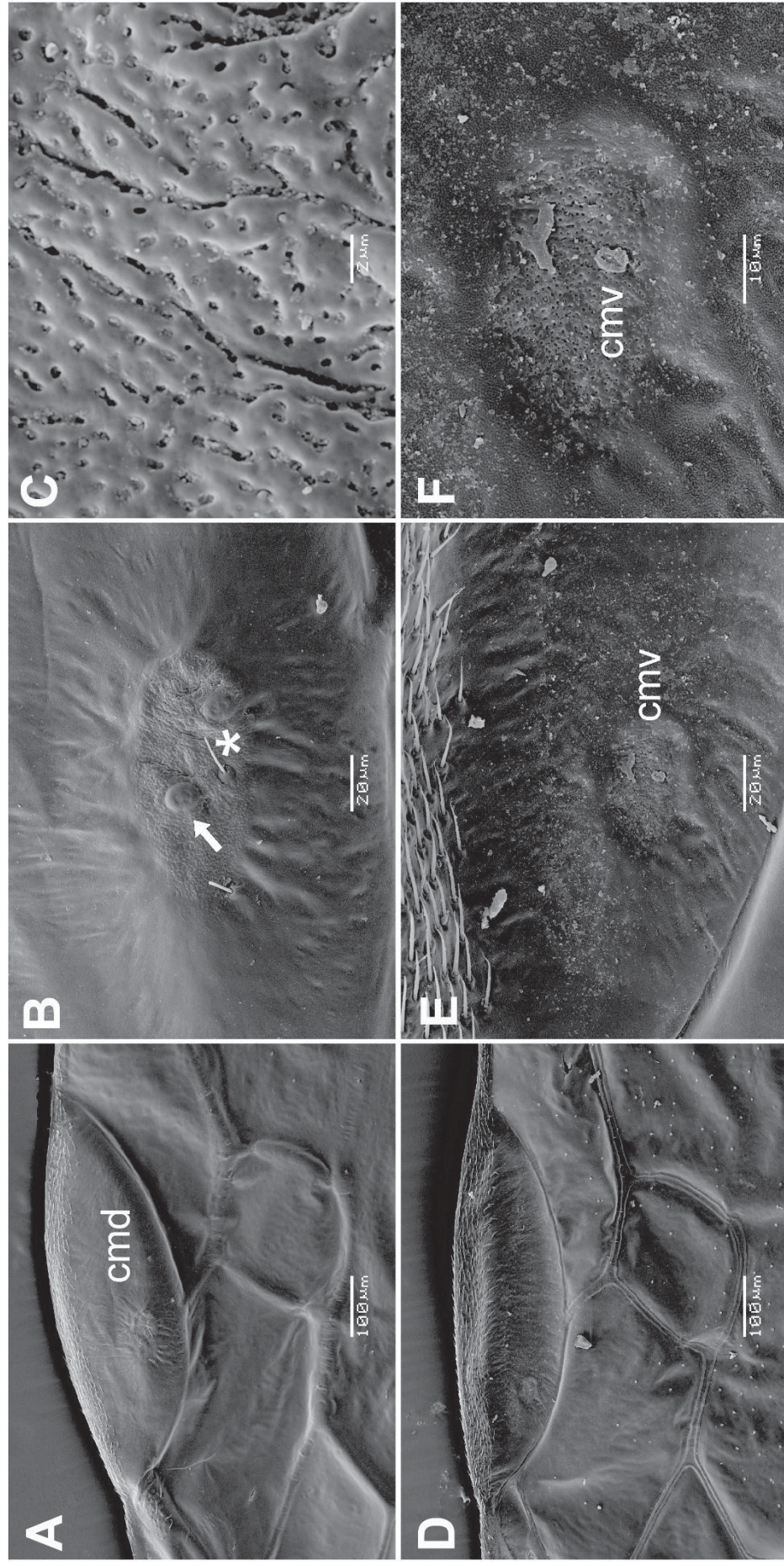


Figura 15 Eletromicrografia (Microscopia Eletrônica de Varredura) do pterostigma de *Incastigmus neotropicus*: (A–C) (cmd) campo de microporos dorsal, (\*) cerdas sobre o pterostigma, (seta) sensores campaniformes. (D–F) (cmv) campo de microporos ventral.



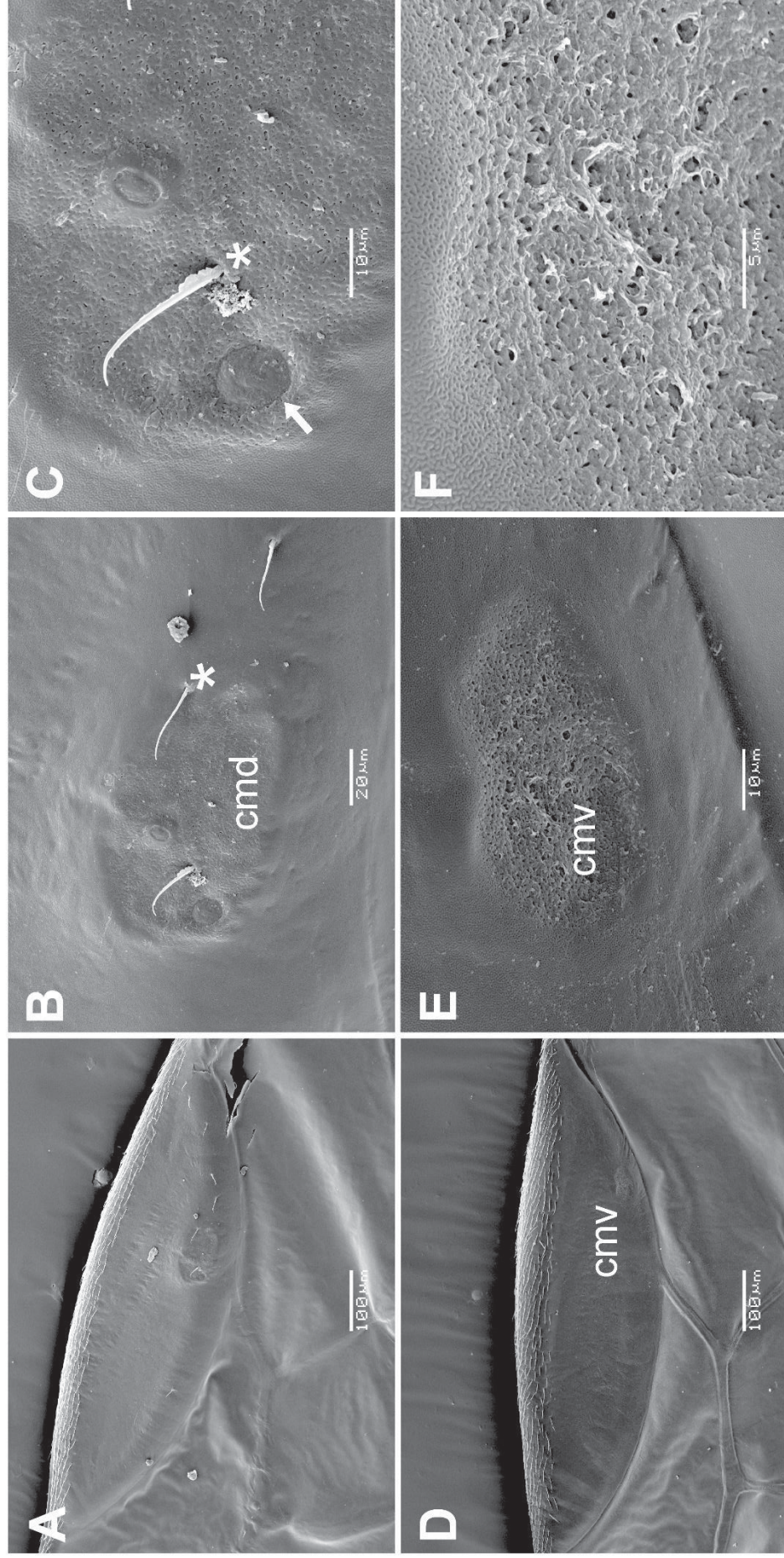


Figura 16 Eletromicrografia (Microscopia Eletrônica de Varredura) do pterostigma de *Llaqhastigmus mantanti*: (A–C) (cmd) campo de microporos dorsal, (\*) cerdas sobre o pterostigma, (seta) sensores campaniformes; (D–F) (cmv) campo de microporos ventral.

## 4.2 Codificação de caracteres em Stigmina

No total, foram construídos seis caracteres morfológicos associados ao pterostigma dos Stigmina. Destes, apenas um com estado múltiplo. A Tabela II apresenta os caracteres e seus respectivos estados nos 8 gêneros dos 14 terminais estudados.

- **Listagem dos caracteres**

### 1. Distribuição de cerdas na superfície dorsal:

(0) completamente uniforme, sem áreas glabras e sem áreas com densidade maior (Fig. 17 A e B; E e F)

(1) cerdas distribuídas por toda a superfície, porém, com densidade maior sobre a área glandular (Fig. 17 C e D)

(2) predominantemente glabro, com cerdas restritas à margem costal ou presentes também sobre o campo de microporos (Fig. 17 G e H)

### 2. Diferenciação de campo de microporos na superfície dorsal:

(0) sem campo diferenciado\* (Fig. 17 A–F)

(1) com campo diferenciado (Fig. 17 G e H)

\*Sem indicação visível em microscopia ótica ou MEV, superfície uniforme e sem diferenças na microescultura.

### 3. Dimensão do campo de microporos na superfície dorsal:

(0) grande

(1) pequeno

Aplica-se apenas aos gêneros *Carinostigmus*, *Stigmus* e *Tzustigmus* que possuem o caráter anterior na condição 1.

### 4. Campo de microporos diferenciado na superfície ventral do pterostigma.

(0) ausente

(1) presente (Figs. 14, 15, 16 D–F)

### 5. Cerdas na membrana alar:

(0) longas

(1) curtas

## 6. Célula radial

(0) com cerdas na membrana

(1) sem cerdas na membrana

Tabela II Matriz de dados dos caracteres codificados a partir do pterostigma de Stigmia.

Gênero	Caracteres					
	1	2	3	4	5	6
<i>Allostigma</i>	0	0	—	0	0	0
<i>Araucastigma</i>	1	0	—	?	1	1
<i>Carinostigma</i>	2	1	1	0	1	1
<i>Ceratostigma</i>	0	0	—	0	0	0
<i>Paracrabo</i>	0	0	—	0	0	0
<i>Parastigma</i>	0	0	—	0	0	1
<i>Stigma</i>	2	1	1	1	1	1
<i>Tzustigma</i>	2	1	0	0	1	1



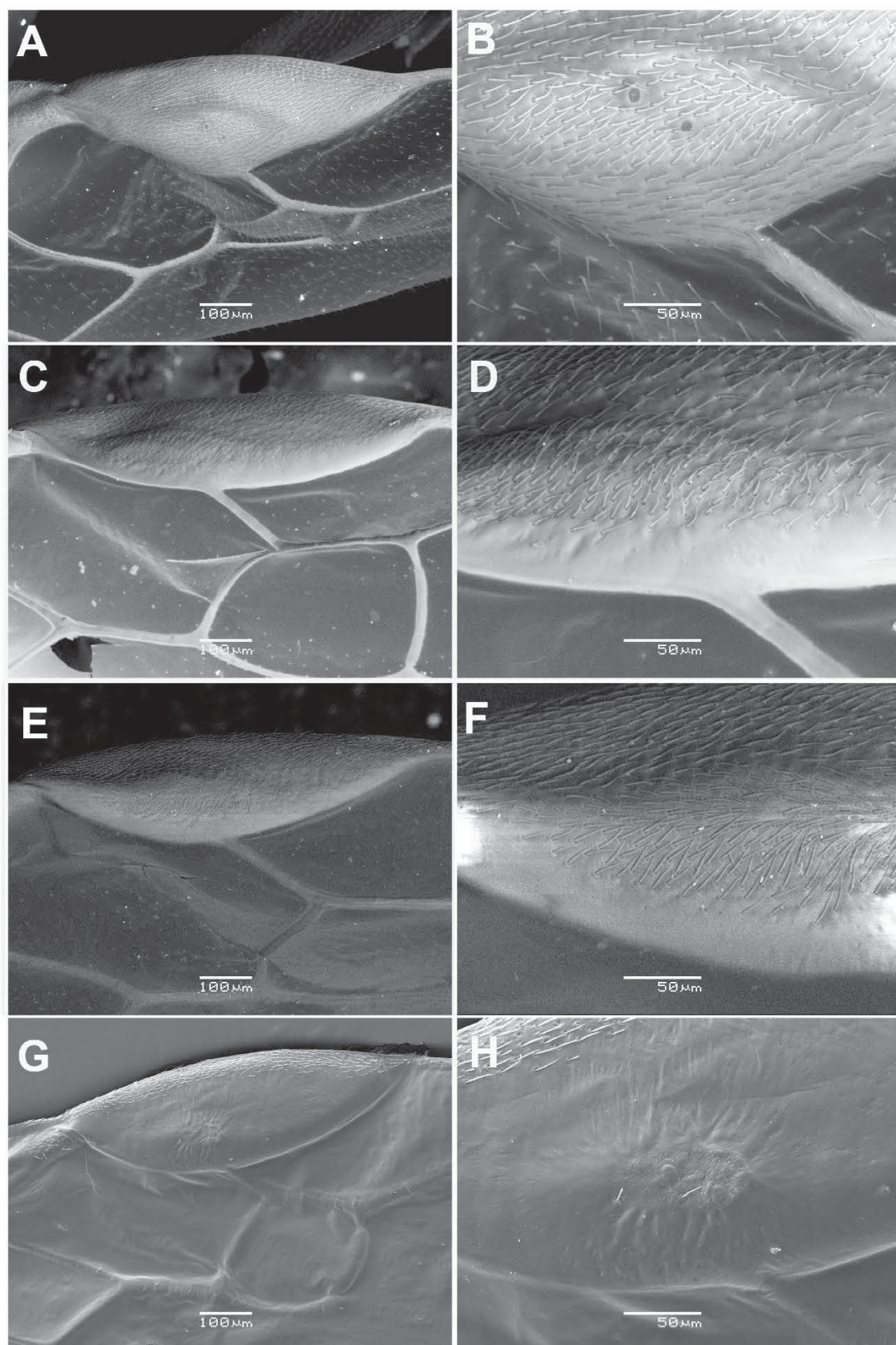


Figura 17 Eletromicrografia (Microscopia Eletrônica de Varredura) ilustrando caracteres do pterostigma de Stigmina: (A–B) pterostigma de *Allostigma*; (C–D) pterostigma de *Araucastigma*; (E–F) pterostigma de *Parastigma*; (G–H) pterostigma de *Incastigma*.

### 4.3 Morfologia comparada do pterostigma em linhagens de Apoidea

- **Morfologia interna do pterostigma em *Spilomena* sp.**

Quando analisado, o gênero *Spilomena* sp. apresentou variação no pterostigma nas quatro regiões seccionadas, ao passo que os constituintes teciduais continuaram os mesmos e foi observado variação na localização em que foram identificados. Para este gênero nota-se a presença de dois polos de tecido amorfo na porção apical e basal do pterostigma e estas regiões encontram-se circundadas por uma grande quantidade de grânulos de pigmento (Fig. 18 A–G). É observada uma diferenciação de pigmentação destas porções granulares, resultantes, provavelmente, de resquícios de secreção celular.

Os grânulos são conspícuos nas extremidades do pterostigma, mas também podem ser encontrados na parte medial do pterostigma (Fig. 18 C, F e G). Nesta região, encontram-se tecidos de sustentação com morfologia muito distinta da observada nas espécies de *Stigmina* (Fig. 18 C). Em *Spilomena* sp., estes reforços medianos são colunares, não possuindo forma de trabéculas e, associado à base do tecido medial estão os corpúsculos, semelhantes aos grânulos de secreção ou a algum tipo celular indefinido.

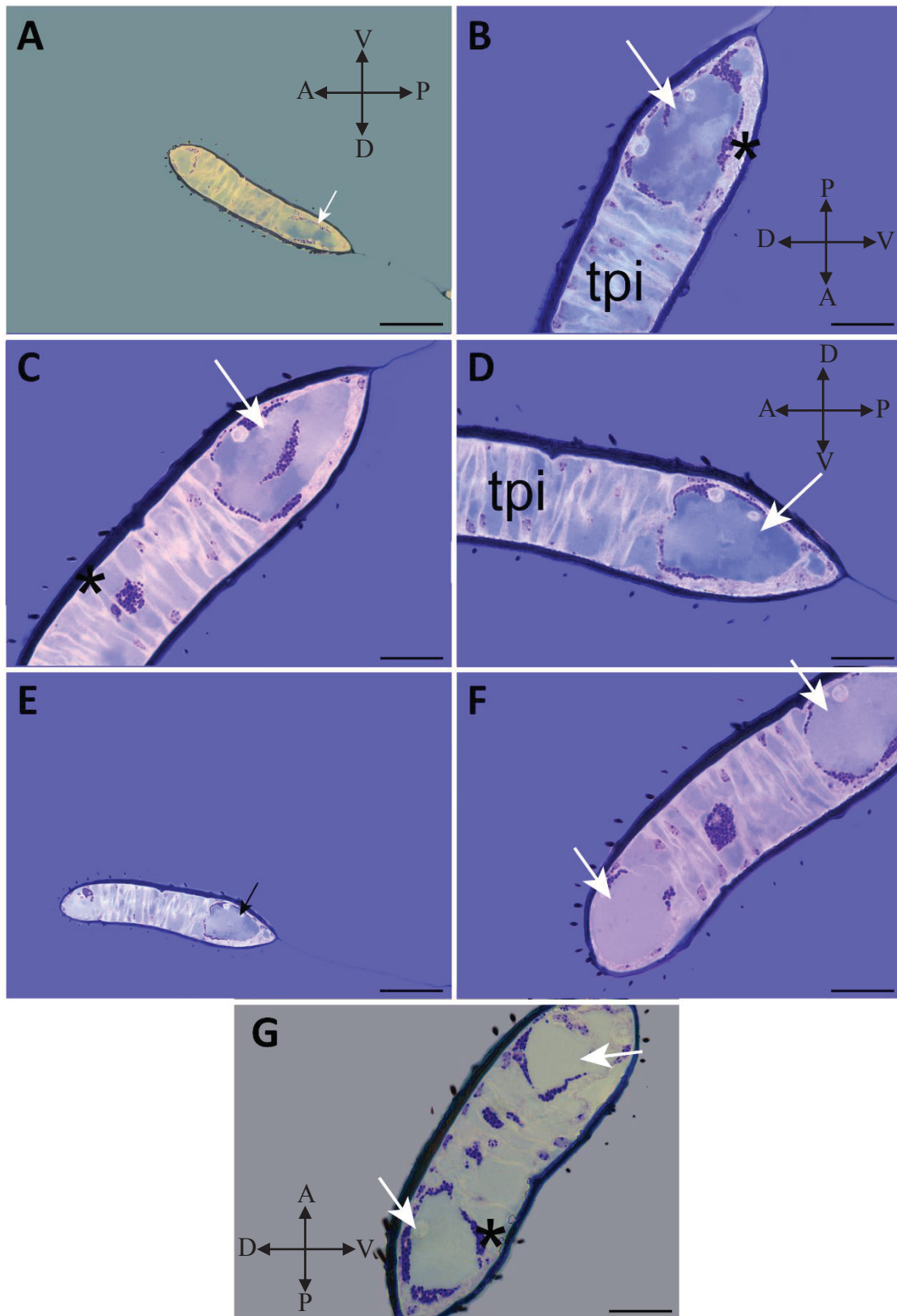


Figura 18 Cortes semifinos do pterostigma de *Spilomena* sp. (A–G): (setas) tecido amorfo; (\*) grânulos de pigmento; (tpi) tecido de preenchimento intermediário. Escala: Figs. A e E: 50µm; Figs. B, C, D, F e G: 20µm



- **Morfologia interna do pterostigma em *Cerceris* sp.**

O gênero em questão apresentou o menor tamanho de pterostigma, sendo esta a maior asa seccionada neste estudo. Houve pouca variação de estruturas ao longo das zonas de cortes (Fig. 19 A–D). Em *Cerceris*, o pterostigma é constituído apenas por uma epiderme de revestimento da camada interna, uma célula ampla e esférica com pequenos grânulos de pigmento associados e o espaço para passagem da hemolinfa (Fig 19 B). Por essa descrição, o gênero parece ter a representação mais simples da morfologia interna do pterostigma. Pequenos artefatos foram gerados durante o corte associados à membrana alar adjacente ao pterostigma.

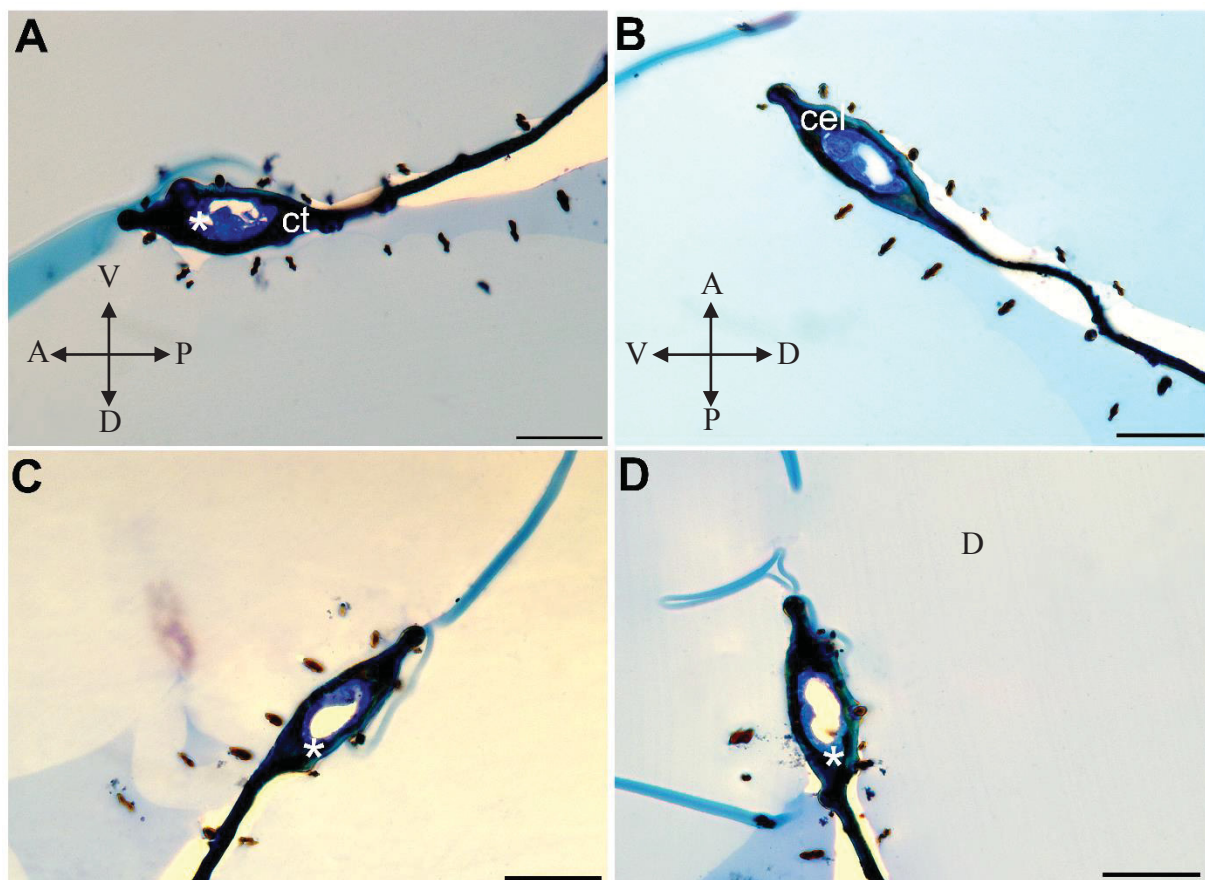


Figura 19 Cortes semifinos do pterostigma de *Cerceris* sp. (A–D): (\*) epiderme; (cel) célula associada a grânulos de pigmento, (ct) cutícula. Escala: 20µm

- **Morfologia interna do pterostigma em *Oxybelus* sp.**

Para *Oxybelus*, a morfologia foi uniforme ao longo das quatro regiões de corte analisadas. Neste, alguns artefatos foram gerados durante o corte, como dobras no material e rompimento de cutícula (Fig 20 C). De forma geral, o espaço para passagem de hemolinfa localiza-se nas regiões apicais onde há presença de grânulos dispersos no

pterostigma. Na porção medial, o tecido de sustentação apresenta-se de forma muito distinta de todos que aqui foram descritos (Fig. 20 A–E). O tecido tem aspecto membranoso não diferenciado e segrega as duas regiões de passagem de hemolinfa. Aspecto distinto comparado aos reforços medianos encontrados em *Spilomena* e em *Stigmina*.

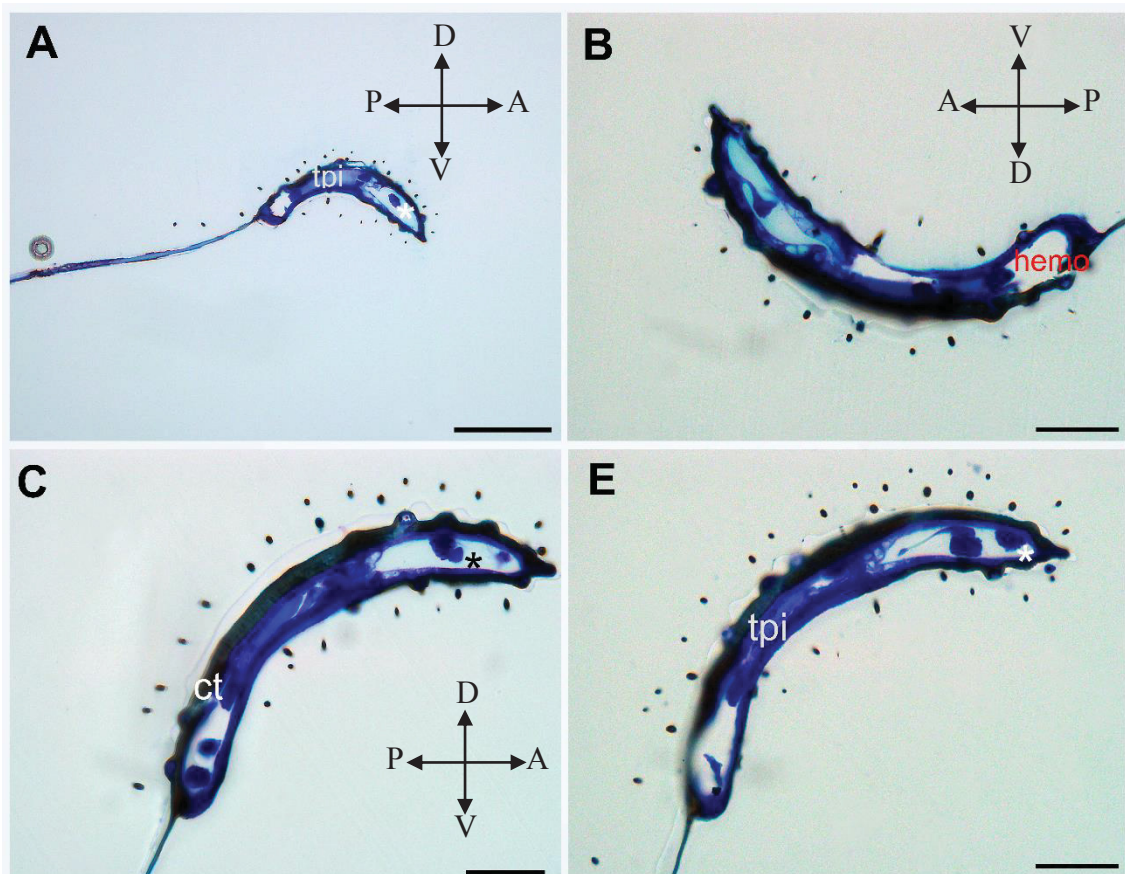


Figura 20 Cortes semifinos do pterostigma de *Oxybelus* sp. (A–D): (\*) grânulos de pigmento; (hemo) espaço de passagem de hemolinfa; (tpi) tecido de preenchimento intermediário (ct) cutícula. Escalas: Fig. A: 50µm; Figs. B–D: 20µm

- **Morfologia interna do pterostigma em *Ectemnius* sp.**

Nas duas primeiras porções, o pterostigma, ainda em fase inicial, apresenta além da epiderme revestindo internamente a estrutura, várias células dispersas (Fig. 21 A e B). As células caracterizam-se por serem esféricas e com núcleo bastante evidente. Ao longo dos cortes, a partir da terceira região, formam-se dois espaços ocos localizados nas extremidades, que são os espaços de circulação de hemolinfa (Fig. 21 C–E).

O tecido preenche as outras porções do pterostigma, somado a células e arranjos de grânulos que se encontram dispersos. Na região 4, os componentes teciduais ainda



são os mesmos do início dos cortes, mas medialmente há uma leve separação do tecido de preenchimento que se assemelha à porção de reforço medial já descrita nos pterostigmas anteriores (Fig. 21 E).

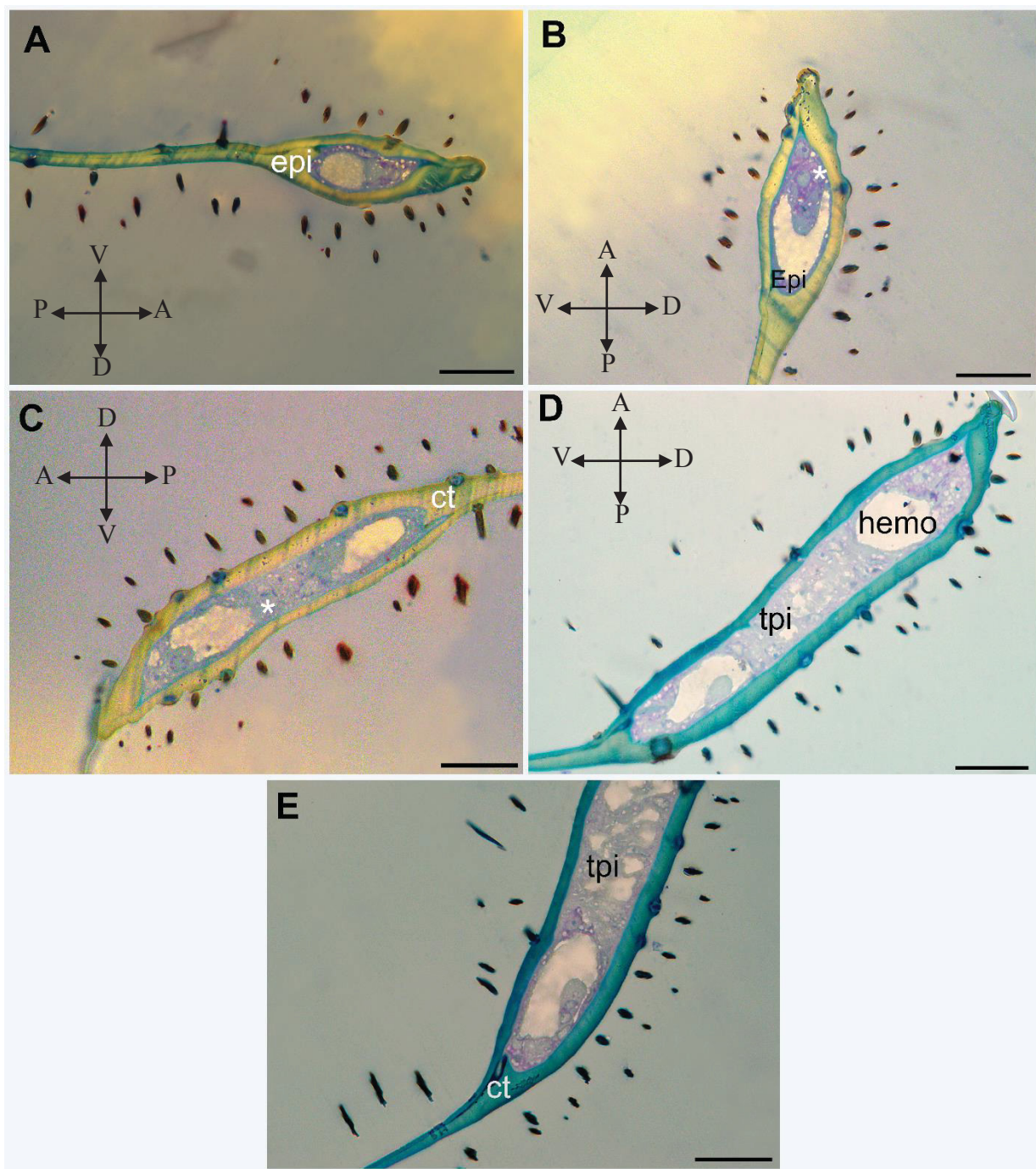


Figura 21 Cortes semifinos do pterostigma de *Ectemnius* sp. (A–E): (epi) epiderme, (\*) células dispersas com núcleo evidente, (tpi) tecido de preenchimento intermediário, (ct) cutícula, (hemo) espaço de passagem de hemolinfa. Escalas: 20μm

- **Morfologia interna do pterostigma em *Rhopalum* sp.**

Este pterostigma muito se assemelha ao descrito para *Spilomena*. Nota-se que o espaço de passagem de hemolinfa é mais reduzido nesses dois grupos e as extremidades são preenchidas com um tecido não diferenciado e circular. Na porção medial, encontra-se o tecido de sustentação colunar que liga a região dorsal e ventral. Ainda na região medial, são encontrados tanto grânulos dispersos quanto grânulos associados à base dos tecidos de sustentação medial (Fig. 22 D e E). Assim como em *Spilomena*, são encontrados corpúsculos de secreção próximos às massas apicais de tecidos não diferenciados.

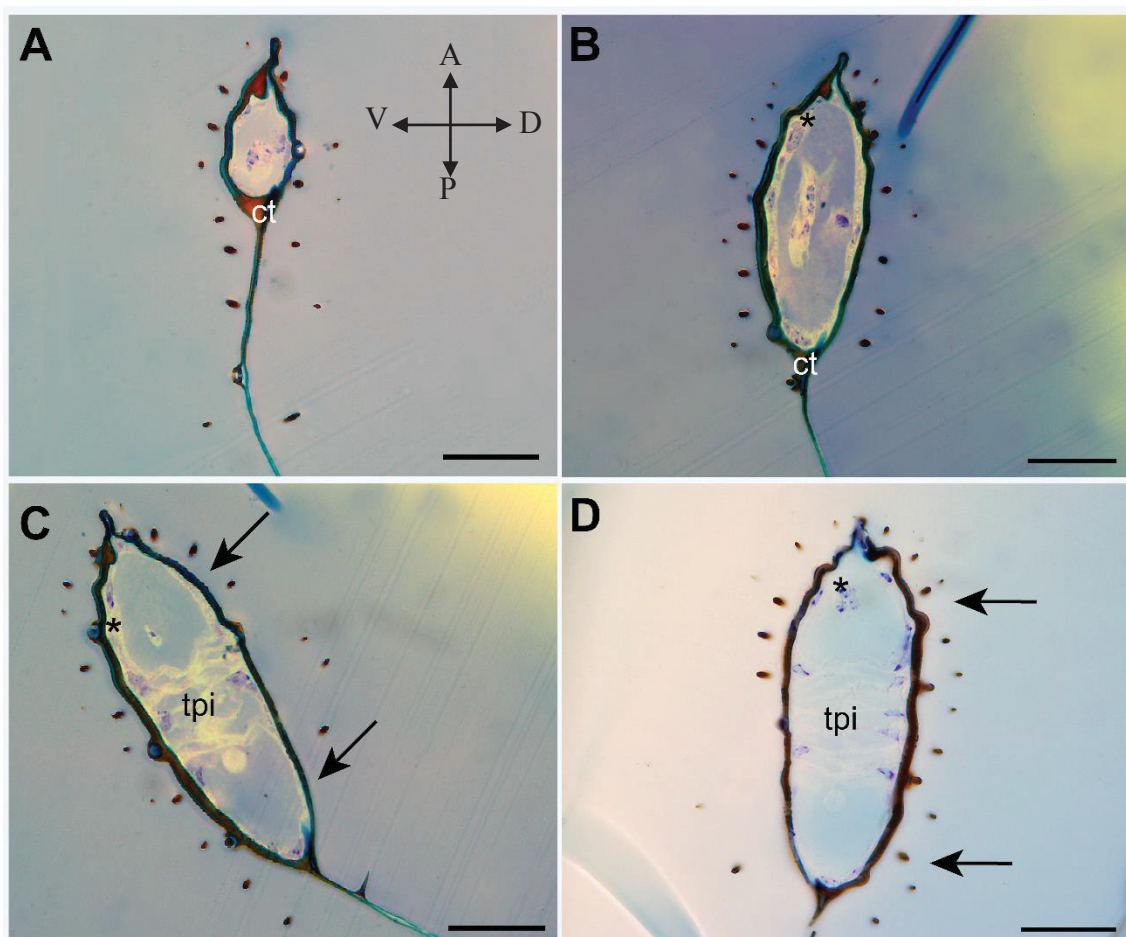


Figura 22 Cortes semifinos do pterostigma de *Rhopalum* sp. (A–D): (\*) células dispersas com núcleo evidente, (setas) tecido apical e basal, (tpi) tecido de preenchimento intermediário, (ct) cutícula Escalas: 20  $\mu$ m



- **Morfologia interna do pterostigma em *Hylaeus* sp.**

A morfologia do pterostigma desta espécie pouco variou ao longo das 4 zonas de corte. Os tecidos mediais de sustentação assemelham-se a uma rede fibrosa, trabéculas, com interações maiores e mais complexas nas regiões desenvolvidas do pterostigma e reduzidas em zonas em que o pterostigma está menos desenvolvido.

O epitélio que reveste o pterostigma é claramente perceptível e associado a ele também é possível observar núcleos de grânulos associados. Nas regiões apicais do pterostigma há um espaço livre para a passagem de hemolinfa (Fig. 23 A–D).

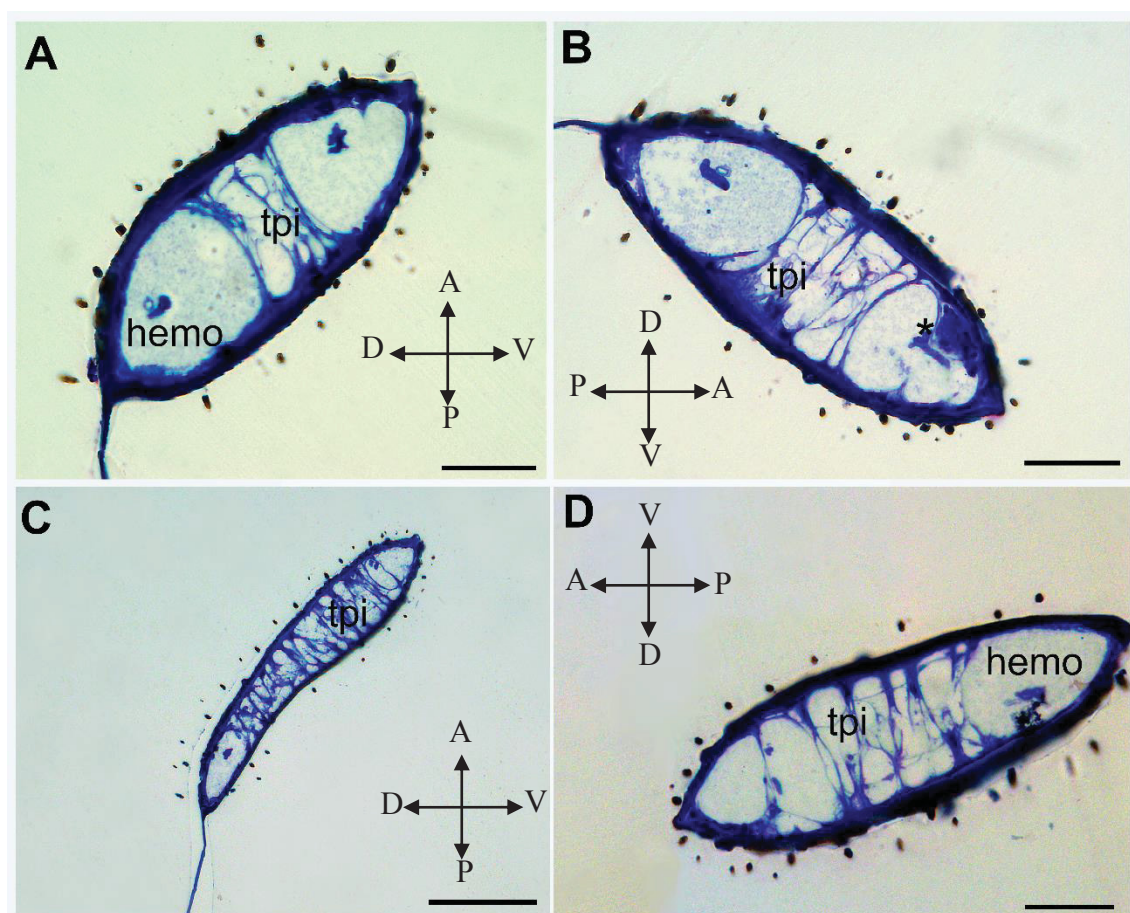


Figura 23 Cortes semifinos do pterostigma de *Hylaeus* sp. (A–D): (tpi) tecido de preenchimento intermediário, (pig) grânulos de pigmento, (ct) cutícula, (hemo) espaço de passagem de hemolinfa. Escalas: Figs. A, B e D: 20µm; Fig. C: 50µm

- **Morfologia interna do pterostigma em *Chilicola* sp.**

Morfológicamente este pterostigma caracteriza-se por ser muito mais amplo do que os anteriormente descritos. Neste, há uma boa quantidade de espaço para passagem de hemolinfa. No entanto, os polos de tecido não diferenciados apresentam-se aqui em formato triangular, dirigindo-se para a parte medial do pterostigma (Fig. 24 A–D). Na parte medial, notam-se os tecidos de sustentação que ligam as regiões dorsal e ventral (Fig. 24 B), apresentando morfologia semelhante ao descrito em *Rhopalum* e *Spilomena*. Também é possível encontrar algumas células esféricas com núcleo evidente dispersas ao longo da estrutura (Fig. 24 A e B). Ademais, há presença de grânulos em menores quantidades associados aos tecidos triangulares não diferenciados e aos de sustentação medial (Fig. 24 D)

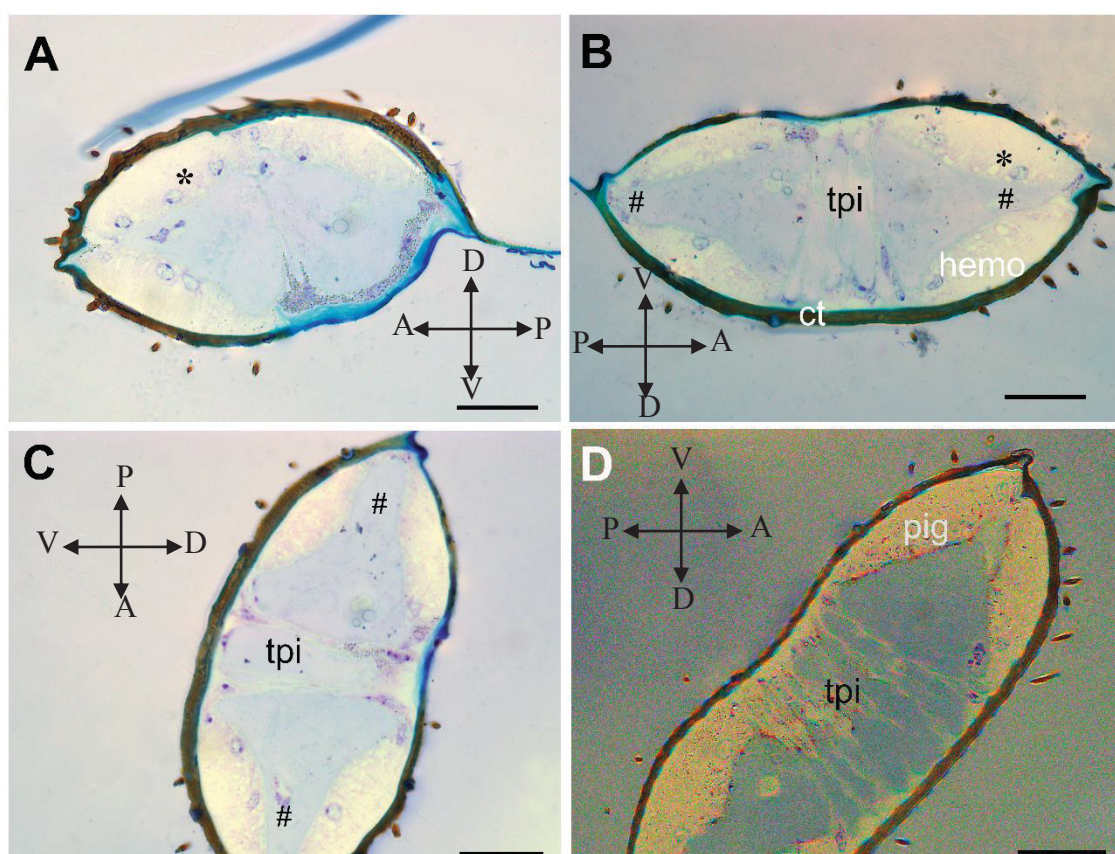


Figura 24 Cortes semifinos do pterostigma de *Chilicola* sp. (A–D): (\*) células dispersas com núcleo evidente, (#) tecido apical e basal triangulares, (tpi) tecido de preenchimento intermediário, (pig) grânulos de pigmento, (ct) cutícula, (hemo) espaço de passagem de hemolinfa. Escala: 20µm

## 5 DISCUSSÃO

Vários estudos já foram realizados sobre glândulas exócrinas em espécies de insetos. No entanto, este é o primeiro trabalho comparativo que descreve glândulas no pterostigma, além de fornecer descrições morfológicas dessa estrutura para indivíduos não só da superfamília Apoidea, mas para a ordem Hymenoptera como um todo. No que se refere à subtribo Stigmina, os cortes histológicos revelam que há uma superfície glandular em pelo menos três gêneros representados por machos e fêmeas. As glândulas no pterostigma com abertura dorsal e ventral estão ligadas a campos de microporos visíveis na morfologia externa. Para a subtribo Stigmina como um todo, reconhecemos seis novos caracteres associados ao pterostigma que podem ser incorporados em futuras análises filogenéticas do grupo. Adicionalmente, fornecemos descrições gerais do pterostigma de vespas apoideas e abelhas com inferências sobre sua função e morfologia.

### 5.1 Estrutura e aspectos ultra-estruturais de glândulas em Stigmina

- **Glândulas exócrinas no pterostigma**

Apesar de uma morfologia e localização impressionantemente variável, glândulas de insetos podem ser classificadas em dois grupos principais de acordo com sua organização celular (NOIROT & QUENNEDEY, 1974, 1991). Segundo estes autores, as glândulas de classe 1, encontradas em espécies de Stigmina, são o tipo mais simples de unidade glandular. São formadas por células epidérmicas que são contíguas à cutícula, e a secreção atravessa a barreira antes de ser liberada.

Os cortes semifinos evidenciam que as células glandulares se ligam diretamente à cutícula, desembocando em campos de microporos nas superfícies dorsal e ventral. Esta característica é conspícua em glândulas de classe 1, como relatado na descrição de glândulas de feromônio dos gêneros *Bombyx* (Lepidoptera) (STEINBRECHT, 1964), *Frankliniella* (Thysanoptera) (KRUEGER, 2015) e *Nomada* (Hymenoptera) (SCHINDLER et al., 2018). Nestes casos, a cutícula pode ser suficientemente porosa para permitir que a secreção alcance o exterior (BILLEN & MORGAN, 1998; QUENNEDEY, 1998).

Ao observar as unidades glandulares do presente estudo, nota-se que a porção citoplasmática se encontra mais desenvolvida do que a região de ligação da célula à cutícula. Células glandulares geralmente apresentam grande quantidade de citoplasma, a abundância deste componente estando relacionada com a intensa atividade bioquímica

associada a vários processos metabólicos, como síntese e secreção (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Ainda no citoplasma das unidades glandulares foi possível observar inúmeras estruturas que sugerem acúmulos de lipídeos. Estes compostos não são armazenados apenas em células especializadas, adipócitos, mas também são depositados em gotículas individuais em vários tipos celulares, constituindo formas eficientes de reserva de energia (GARTNER & HIATT, 2006). Isto é uma característica importante, visto que as organelas citoplasmáticas formam o local de intensa atividade metabólica que contribuem para a elaboração de feromônios (BILLEN, 1991).

Quando observados por meio de microscopia de luz, o aspecto histológico de glândulas epiteliais é muito parecido entre as espécies de *Stigmina*. No entanto, quando vistas do ponto de vista ultra-estrutural, maiores diferenças poderão ser detectadas, até mesmo entre indivíduos da mesma espécie (CRUZ-LANDIM, 2008). Embora possam ocorrer diferenças na composição química, características comportamentais e aspectos anatômicos, a organização morfológica geral das glândulas entre os indivíduos geralmente foi a mesma. O número de células pode variar consideravelmente, mas sua aparência geral dificilmente difere (BILLEN & AL -KHALIFA, 2018).

- **Inferências sobre a função das glândulas em *Stigmina***

Devido à ausência de estudos bioquímicos e informações ultra-estruturais completas, as inferências sobre possíveis funções das glândulas do pterostigma ainda são cautelosas. Uma das fontes de incerteza é o fato de que uma glândula pode ter diversas funções biológicas (NOIROT & QUENNEDEY, 1991). Por exemplo, as funções das mesmas glândulas podem variar entre subfamílias de formigas (BILLEN E MORGAN, 1998). Apesar disso, nós realizamos comparações entre as glândulas aqui descritas e aquelas já conhecidas para outros artrópodes, tentando assim revelar homologies estruturais e analogias funcionais.

As glândulas exócrinas são conhecidas especialmente pela produção de um amplo espectro de feromônios. Contudo, esta não é a única função atribuída a estas estruturas, uma vez que estas podem ainda ser úteis para produção de substâncias de defesa, lubrificantes, enzimas digestivas (BILLEN & SOBOTNÍK, 2015). No presente estudo, encontramos associados ao pterostigma estruturas que se assemelham a sensores campaniformes. Estes sensores foram encontrados em todas as espécies analisadas e sua distinção foi possível em morfologia externa e interna. Pass (2018) discorre sobre a presença de sensores campaniformes em asas de insetos como estruturas muito



pequenas e elevações mais ou menos circulares. O autor ainda comenta que estas estruturas são mecanorreceptores com funções desde o controle do voo a funções vitais (i.e., estímulos para orientação, percepção de predadores). Os cortes histológicos revelaram a ligação íntima das células glandulares aos sensores campaniformes externos. Aparentemente há uma modificação da estrutura celular em que a célula parece desprender em um tipo de secreção holócrina. Dessa forma, à medida que as células secretoras amadurecem, elas morrem e tornam-se produto de secreção (GARTNER & HIATT, 2006).

É válido ressaltar que a descoberta de glândulas nas asas não é exclusividade do presente estudo. Para ordem Lepidoptera, já foram feitos registros de glândulas que secretam feromônios sexuais restritas quase que exclusivamente aos machos (KRISTENSEN & SIMONSEN, 2003). Curiosamente, em Lepidoptera, as glândulas nas asas encontram-se espalhadas pela asa ou em regiões especiais chamadas estigmas (PASS, 2018).

Pouco é sabido sobre a história de vida dos Stigmina, mas alguns relatos mencionam a ocorrência de compartilhamento de ninho dentro do grupo (IWATA, 1964; BOHART & MENKE, 1976; MELO, 2000). O melhor entendimento da história de vida destes organismos poderia nos auxiliar em melhores propostas para funções desse conjunto de glândulas. A estrutura geral das glândulas em Stigmina muito se assemelha às glândulas feromônicas sexuais encontradas em abelhas (SCHINDLER et al., 2018) e traças (KRUEGER, 2015), isso nos dá indicativos de uma das funções que a glândula no pterostigma pode desempenhar. Os feromônios podem servir para uma gama de funções, dentre elas: atração de parceiros para cópula, ou indivíduos para exploração de recursos, defesa, reconhecimento de parentesco, marcação de territórios, pistas de localização e forrageamento (SYMONDS & ELGAR, 2008).

Infelizmente, o tamanho reduzido das glândulas no pterostigma torna difícil o uso de bioensaios para elucidar a possível função da mesma. É válido ressaltar que, ainda que um grande número de glândulas exócrinas tenha sido descrito para os insetos nos últimos anos, as funções das mesmas, em alguns casos, ainda são desconhecidas (BILLEN & MORGAN, 1998; BILLEN, 2006). Além disso, apesar dos tipos celulares que compõem as glândulas apresentarem os mesmos elementos básicos, a ultra-estrutura revela constituintes celulares que indicam produtos de secreção variando de glândula para glândula (CRUZ-LANDIM, 2008). Dessa forma, estudos adicionais de ultra-

estrutura ou estudos bioquímicos poderão revelar qual o conteúdo das secreções das espécies de Stigmina.

## 5.2 Codificação de caracteres em Stigmina

- **Caracteres ligados ao pterostigma apresentam sinal filogenético**

A utilização da microscopia eletrônica de varredura aliado ao conhecimento da taxonomia clássica permite o reconhecimento de caracteres úteis para a sistemática de diversos grupos de artrópodes (GAINETT et al., 2018). Aqui, nós amostramos indivíduos representando todos os gêneros reconhecidos para a subtribo Stigmina (sensu FINNAMORE, 1995) a fim de realizar análises morfológicas do pterostigma. Estas análises resultaram em quatro caracteres informativos. Com o auxílio das ferramentas de microscopia, observamos que no pterostigma dos Stigmina há uma região distinta na porção medial-posterior que é ventralmente convexa de forma conspícua. Este resultado corrobora a informação anteriormente codificada por Melo (1999), compreendendo não só os Stigmina, mas também outros grupos dentro da subfamília Pemphredoninae.

Dos caracteres aqui fornecidos, três deles merecem maiores detalhamentos por representarem uma especialização gradual dentro de Stigmina. O caráter 1 está relacionado com uma distinta diferenciação da distribuição de cerdas entre três grupos dentro da subtribo. Os gêneros *Allostigmus*, *Ceratostigmus*, *Paracrabro* e *Parastigmus* apresentam distribuição de cerdas uniformes sem áreas com densidade maior, enquanto que em *Araucastigmus* há uma modificação na distribuição destas cerdas com uma tendência a maior densidade na área glandular. Em *Stigmus*, *Incastigmus* e *Llaqhastigmus*, *Carinostigmus* e *Tzustigmus* observa-se uma completa especialização desta estrutura, apresentando um pterostigma glabro e com cerdas espaçadas sobre o campo de microporos. As cerdas sobre o pterostigma dos gêneros citados parecem distintas das encontradas nos outros Stigmina. Esta característica parece estar restrita ao campo de microporos como observado nas espécies de Stigmina utilizadas no presente estudo, nos registros feitos por Melo (1999) para o gênero *Stigmus*, assim como o observado em *Tzustigmus* (FINNAMORE, 1995) e *Carinostigmus* (KROMBEIN, 1984).

O caráter 2 destaca que a diferenciação em um campo de microporos é exclusiva dos gêneros acima citados como possuindo uma especialização nas cerdas do pterostigma (isto é, que possuem o estado 2 no caráter 1). Dessa forma, nota-se que claramente há uma modificação gradual dessas estruturas que estão intimamente ligadas



e o desenvolvimento de um campo de microporos parece estar relacionado com estigmas glabros.

Por fim, o caráter 4 versa sobre a diferenciação de um campo de microporos adicional, localizado na superfície ventral do pterostigma. Esta característica foi encontrada aqui pelos gêneros “*Stigmus*”, *Incastigmus* e *Llaqhastigmus*, bem como em *Aykhustigmus* Finnamore, 1995 (G.A.R. Melo, informação pessoal). Após os cortes histológicos, pudemos afirmar que essa abertura adicional também corresponde à presença de outra glândula com saída na superfície ventral.

- **Glândulas exócrinas podem auxiliar o estudo de relações filogenéticas em Stigmina**

Devido às limitações de amostragem, não podemos afirmar se de fato há glândulas no pterostigma de todos os Stigmina. No entanto, este trabalho fornece os primeiros passos para o entendimento de como se deu a modificação desta estrutura dentro do grupo, visto que, até o momento nenhum estudo morfológico detalhado havia sido desenvolvido de forma comparativa com esta finalidade. Certamente, as características aqui levantadas fornecerão subsídios para futuras análises filogenéticas com um novo conjunto de caracteres descritos. De fato, caracteres codificados a partir de morfologia externa e da descrição de epitélios glandulares e sensoriais já se mostram úteis para o entendimento da história evolutiva de outros grupos de artrópodes (GNASPINI & RODRIGUES, 2011; GAINETT et al., 2018).

No que se refere aos insetos, Billen e Morgan (1998) já comentavam que as glândulas exócrinas podem representar neoformações servindo como características exclusivas desde o nível específico até famílias. Situações assim já foram evidenciadas em trabalhos utilizando outros grupos da ordem Hymenoptera. Cruz-Landim (1967) em um estudo completo sobre anatomia, histologia e desenvolvimento de diferentes sistemas de glândulas em abelhas, comenta que muitas características glandulares são conservadas quando comparadas entre subfamílias distintas. Cruz-Landim (2008) discorre sobre glândulas de cera em meliponíneos, as quais apresentam organização ultra-estrutural semelhante dentro da tribo, reforçando que, a partir de um certo nível, as glândulas podem ser úteis para o entendimento das relações filogenéticas.

Para a família Crabronidae, uma análise comparativa de glândulas da cabeça de machos e fêmeas da subfamília Philantinae apresenta diferentes situações de desenvolvimento destas glândulas (WEISS et al., 2017). Em uma delas, as glândulas das

fêmeas analisadas caracterizam-se por serem uniformes nos sistemas de células secretoras, enquanto que os machos apresentam uma maior variação da estrutura, provavelmente sob efeito de seleção sexual. Esse fato distingue do que foi relatado no presente estudo, visto que a morfologia e localização das glândulas e células secretoras pouco variou entre os dois sexos das espécies analisadas.

Diante do exposto, é importante inspecionar a morfologia interna das células do pterostigma de outros gêneros da subtribo Stigmina. Os caracteres morfológicos aqui codificados podem corresponder a modificações na diferenciação do tecido epitelial que reveste internamente o pterostigma dessas vespas. O entendimento de como esse sistema de glândulas se originou nos Stigmina é útil para uma melhor caracterização do grupo do ponto de vista sistemático. Além disso, acrescenta novas contribuições para o entendimento da história de vida destas espécies, resultando em informações que relacionem comportamento e morfologia.

### **5.3 Morfologia comparada do pterostigma em linhagens de Apoidea**

No presente estudo, fornecemos as primeiras descrições histológicas do pterostigma da ordem Hymenoptera. Desde o trabalho de Arnold (1963) estudos como este eram aclamados devido à falta de informações sobre esta estrutura entre as diferentes ordens de insetos e sua possível utilidade para o entendimento de características relacionadas à evolução do voo. Aqui nos detemos às diferentes características encontradas entre gêneros da família Crabronidae, a partir de uma caracterização geral dos componentes internos do pterostigma.

Entre as espécies analisadas, é notável uma morfologia distinta dos componentes internos do pterostigma. Contudo, não foi possível reconhecer características que pudessem ser exclusivas de subfamílias, por exemplo. Por outro lado, os estigmas analisados possuíam constituintes muito semelhantes, como: células epiteliais revestindo toda a cavidade, espaços ociosos pelos quais flui a hemolinfa, nervos e traqueia. Estas características abrangem os componentes básicos que são frequentemente designados como constituintes de uma veia comum em insetos (CHAPMAN, 1982; APPEL et al., 2015). Adicionalmente, reconhecemos aqui a presença de grânulos de pigmentos dispersos ou agrupados, tecidos de preenchimento que podem estar localizados nas regiões apicais da cavidade, suportes intermediários que ligam as regiões dorsal e ventral, e eventuais células esféricas que são encontradas dispersas no pterostigma. Tendo em vista que as únicas descrições histológicas de pterostigma foram

fornecidas por Bicchierai & Moretti (1988) e Franielczyk-Pietyra & Wegierek (2017), algumas analogias foram feitas com base nestes estudos.

Com exceção de *Cerceris*, todos os gêneros aqui estudados apresentavam na região mediana do pterostigma um padrão de reforços que ligam as regiões dorsal e ventral. A morfologia desses reforços variou entre os indivíduos amostrados desde formas de trabéculas até formas colunares. Franielczyk-Pietyra & Wegierek (2017), em estudo da morfologia de uma espécie de Hemiptera, também reconhecem um componente semelhante, mas acreditam que estas ligações teriam constituição quitinosa e viria a auxiliar o desempenho do voo. Já Bicchierai & Moretti (1988) descrevem esta região como feixes de microtúbulos que atravessam o pterostigma transversalmente. Embora apresentem morfologia semelhante, em Hymenoptera estes reforços não parecem ser quitinosos, mas sim um tecido de preenchimento ou alguma diferenciação do epitélio que reveste esta cavidade. Quanto ao feixe de microtúbulos, parece ter sido uma interpretação equivocada, uma vez que estes são componentes intracelulares, não correspondendo a estruturas que são indicadas nas imagens do trabalho.

Curiosamente, nos gêneros *Cerceris*, *Ectemnius* e *Oxybellus* os reforços intermediários e tecidos de preenchimento das regiões apicais estavam ausentes ou pouco desenvolvidos. Quando Norberg (1972) investigou a função aerodinâmica do pterostigma, o autor descobriu que o pterostigma dos Odonata tem área maior que a região membranosa adjacente. Este aumento de massa serviria como um ponto de regulação inerte do voo. Sem dúvidas, este parece ser o caso dos Hymenoptera, uma vez que os reforços intermediários e os tecidos de preenchimento constituem um maior acréscimo em massa no pterostigma. De acordo com Danforth (1989), se a hipótese de Norberg se aplica ao estigma dos himenópteros, esta região com tamanho desproporcional em vespas e abelhas pequenas viria a melhorar o voo a partir de uma regulação passiva. Além disso, isso explicaria porque *Cerceris*, *Ectemnius* e *Oxybellus* apresentam pouco ou nenhum reforço intermediário ou tecidos de preenchimento. Esta característica pode estar ligada à alometria negativa, uma vez que himenópteros menores apresentam maiores pterostigma em relação à superfície da asa, como postulado por Danforth (1989). Contudo, este parâmetro carece de outras investigações mais amplas, visto que em Crabronidae esta alometria negativa pode não ser uma condição uniforme (Melo, 1999).

Outro ponto a ser observado é a presença de grânulos ao longo do pterostigma. Os grânulos foram encontrados em todas as espécies estudadas, apresentando-se em

grandes ou pequenas quantidades (agrupados ou dispersos). As informações ultra-estruturais de *Stigmaeus* nos indicam que estes grânulos são grânulos de pigmento. Estruturalmente muito semelhantes aos encontrados em órgãos visuais de larvas de Argidae (Hymenoptera) (WANG & HUA, 2018). Os grânulos não são considerados constituintes de uma veia comum. Logo, sendo o pterostigma um ponto esclerotizado e pigmentado na asa (ARNOLD, 1963) os pigmentos secretados no interior da cavidade são incorporados à epiderme dando a ela uma cor enegrecida. A variação na quantidade e organização destes compostos, provavelmente, responde a características específicas de cada grupo. Em Trichoptera, Bicchierai & Moretti (1988) também mencionam a ocorrência de células com citoplasma rico em grânulos de pigmentos localizados internamente no pterostigma.

Arnold (1963) destaca uma função principalmente fisiológica para o pterostigma, o qual seria um canal em que a hemolinfa percorre livremente. No presente estudo, notou-se que esses espaços de passagem de hemolinfa eram variáveis, mas sempre presentes. Nas espécies de *Spilomena* e *Rhopalum* os espaços são menos evidentes, estando restritos às regiões intercalares dos componentes que preenchem o pterostigma dessas espécies. Dessa forma, aqui corroboramos o que foi descrito por Arnold (1963) o qual afirma que em Hymenoptera, a hemolinfa percorre o pterostigma sem hesitação. Alguns dos estigmas observados não apresentaram grandes especializações internas, como observado em *Cerceris*, *Hylaeus* e *Oxybelus*. Provavelmente nestes indivíduos o pterostigma representa apenas um canal de passagem de fluídos na asa sem outras implicações metabólicas.

Como observado no presente estudo, a morfologia interna do pterostigma variou consideravelmente entre os gêneros, mesmo aqueles que pertenciam à mesma subfamília. No entanto, em Stigmina, a morfologia geral do pterostigma pouco variou entre as espécies analisadas. Deste modo, sabendo que estudos com morfologia comparada se fazem necessários para o melhor entendimento das relações entre espécies e até entre gêneros distintos (MORAES & DUARTE, 2009), o estudo do pterostigma entre diferentes gêneros e tribos pode fornecer características exclusivas para estes.

A presença do pterostigma em Hymenoptera é um caráter conspícuo que é utilizado frequentemente para distinção de grupos. No entanto, estudos mais amplos ainda são incipientes. Os primeiros passos nesse sentido vêm sendo desenvolvidos para subfamílias de Ceraphronidae. Os autores reconhecem que a presença do pterostigma parece corresponder ao tamanho do corpo. A partir dessas informações são gerados



questionamentos evolutivos sobre perda e ganho desta estrutura e proposições de estudos que explorem as mudanças do tipo de voo dentro da família (MIKÓ et al, 2018). Os trabalhos mais completos sobre o pterostigma seguem sendo os desenvolvidos para a ordem Odonata. Contudo, sabendo que o pterostigma em Hymenoptera é estrutural, posicional e provavelmente até funcionalmente diferente de Odonata (ARNOLD, 1963), as comparações tornam-se distantes. A exploração da morfologia, ultra-estrutura, aspectos biomecânicos e fisiológicos se faz necessária para um melhor entendimento de questões evolutivas dentro da ordem.

## 6 CONCLUSÕES

Aqui, nós apresentamos que a morfologia das glândulas entre gêneros da subtribo Stigmina são notavelmente uniformes. No entanto, algumas diferenças encontradas no presente trabalho como, espessura do pterostigma e diferenças entre turgidez das células, podem representar características de gêneros com variações entre espécies. Apesar disso, as características aqui levantadas, seja para Stigmina ou para os outros grupos descritos, representam características morfológicas que podem servir para distinção destes táxons. Ademais, a análise do pterostigma ou de outras microestruturas são importantes para fornecer uma nova fonte para interpretação de dados. Exemplos disso foram os seis caracteres que puderam ser construídos para a subtribo Stigmina utilizando apenas morfologia externa, além da descrição de um sistema de glândulas que pode ter significância para o entendimento da história de vida destas vespas.

É sabido que o pterostigma tem função mecânica e fisiológica. Neste trabalho, demonstramos que o pterostigma também pode apresentar uma importante função de comunicação química. Além disso, fornecemos os primeiros *insights* sobre a morfologia interna de uma estrutura que é conspícua nos Hymenoptera e pode revelar ainda muito sobre a dinâmica do voo dentro da ordem.

Adicionalmente, ressaltamos a aplicação de técnicas histológicas e outras microscopias, visto que estas constituem ferramentas alternativas para descrição de características morfológicas, facilitando assim a aquisição de dados anatômicos precisos. Isso permite que sistematas compilem conjuntos de dados morfológicos detalhados, possibilitando a utilização de ferramentas tanto morfológicas quanto moleculares, as quais são essenciais para reconstruções filogenéticas modernas

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNARSSON, I.; KUNTNER, M. Taxonomy in a changing world: seeking solutions for a science in crisis. **Systematic Biology**, v. 56, n. 3, p. 531-539, 2007.
- APPEL, E. et al. Ultrastructure of dragonfly wing veins: composite structure of fibrous material supplemented by resilin. **Journal of Anatomy**, v. 227, n. 4, p. 561-582, 2015.
- ARNOLD, J. W. A note on the pterostigma in insects. **The Canadian Entomologist**, v. 95, n. 1, p. 13-16, 1963.
- BARBOSA, P.; BERRY, D.; KARY, C. K. **Insect Histology: Practical Laboratory Techniques**. John Wiley & Sons, 2015.
- BERGMANN, P. et al. Morphology of hindwing veins in the shield bug *Graphosoma italicum* (Heteroptera: Pentatomidae). **Arthropod Structure & Development**, v. 47, p. 375-390, 2018.
- BEUTEL, R. G.; KRISTENSEN, N. P. Morphology and insect systematics in the era of phylogenomics. **Arthropod Structure & Development**, v. 4, n. 41, p. 303-305, 2012.
- BICCHIERAI, M. C.; MORETTI, G. P. Le ali di *Apatania volsorum* sp. n. (Trichoptera Apataniinae). In: **Atti XV Congresso nazionale italiano di Entomologia**, p. 169-176, 1988.
- BILLEN, J. et al. Morphology and ultrastructure of the Dufour gland of *Myzinum* sp. (Tiphidae). **Journal of Hymenoptera Research**, v. 55, p. 109, 2017.
- BILLEN, J. Occurrence and structural organization of the exocrine glands in the legs of ants. **Arthropod Structure & Development**, v. 38, n. 1, p. 2-15, 2009.
- BILLEN, J. Signal variety and communication in social insects. In: **Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology-Netherlands Entomological Society**, v. 17, p. 9-25, 2006.
- BILLEN, J. Ultrastructural organization of the exocrine glands in ants. **Ethology Ecology and Evolution**, v. 3, n. sup1, p. 67-73, 1991.
- BILLEN, J.; AL-KHALIFA, M. Morphology and ultrastructure of the mandibular gland in the ant *Brachyponera senaarensis* (Hymenoptera, Formicidae). **Micron**, v. 104, p. 66-71, 2018.

- BILLEN, J.; MORGAN, E. D. Pheromone communication in social insects: sources and secretions. In: **Pheromone communication in social insects: ants, wasps, bees, and termites**. WestView Press. Cap.1. p. 3-33, 1998.
- BILLEN, J.; SOBOTNIK, J. Insect exocrine glands. **Arthropod Structure & Development**, v. 44, p. 399-400, 2015.
- BOHART, R. M.; MENKE, A. S. Sphecids of the world: a generic revision. **University of California Press**, 1976.
- CHAPMAN, R. F. The insects: structure and function. **Cambridge University Press**, 1982.
- CRUZ- LANDIM, C. Estudo comparativo de algumas glândulas das abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e respectivas implicações evolutivas. **Arquivos de Zoologia**, v. 15, n. 3, p. 177-290, 1967.
- CRUZ-LANDIM, C. Abelhas. **Morfologia e função de sistemas**. UNESP, São Paulo, 2008.
- DANFORTH, B. N. The evolution of hymenopteran wings: the importance of size. **Journal of Zoology**, v. 218, n. 2, p. 247-276, 1989.
- FERNÁNDEZ, F.; SHARKEY, M. J. Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical. Bogotá D.C.: **Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia**. Editora Guadalupe Ltda, 2006.
- FINNAMORE, A. T. Revision of the world genera of the subtribe Stigmina (Hymenoptera: Apoidea: Sphecidae: Pemphredoninae), Part 1. **Journal of Hymenoptera Research**, v. 4, p. 204-284, 1995.
- FRANIELCZYK-PIETYRA, B.; WEGIEREK, P. The forewing of the *Aphis fabae* (Scopoli 1763) (Hemiptera, Sternorrhyncha): a morphological and histological study. **Zoomorphology**, v. 136, n. 3, p. 349-358, 2017.
- FRIEDRICH, F. et al. Insect morphology in the age of phylogenomics: innovative techniques and its future role in systematics. **Entomological Science**, v. 17, n. 1, p. 1-24, 2014.
- FRIEDRICH, F.; BEUTEL, R. G. Micro-computer tomography and a renaissance of insect morphology. In: **Developments in X-Ray Tomography VI**. International Society for Optics and Photonics, 2008.



- GAINETT, G. et al. The sensory equipment of a sandokanid: An extreme case of tarsal reduction in harvestmen (Arachnida, Opiliones, Laniatores). **Journal of morphology**, p. 1-18, 2018.
- GAINETT, G. et al. Ultrastructure of chemoreceptive tarsal sensilla in an armored harvestman and evidence of olfaction across Laniatores (Arachnida, Opiliones). **Arthropod Structure & Development**, v. 46, n. 2, p. 178-195, 2017.
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Color textbook of histology e-book**. Elsevier Health Sciences, 2006.
- GENESER, F. **Histologia com bases biomoleculares**. 3 a Edição. Editorial Médica Panamericana, p.141,2003.
- GNASPINI, P.; RODRIGUES, G. C.S. Comparative study of the morphology of the gland opening area among Grassatores harvestmen (Arachnida, Opiliones, Laniatores). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 49, n. 4, p. 273-284, 2011.
- GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S.; ENGEL, M. S. **Evolution of the Insects**. Cambridge University Press, 2005.
- HEYMER, V.A. Der stammesgeschichtliche Aussagewert der Pterostigma-Oberflächenfeinstruktur bei Odonaten 1, 2. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 13, n. 2, p. 81-91, 1975.
- JANZEN, D. H. et al. Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 1-26, 2009.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica: Texto & Atlas**. 12th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- KARNOVSKY, J. M. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J. Cell Biology**, v. 27, p. 137-139, 1965.
- KRISTENSEN, N.P., SIMONSEN, T.J. Hairs and scales. In: Kristensen, N.P. (Ed.), **Handbook of Zoology**, Lepidoptera, Moths and Butterflies. Vol. 2: Morphology, Physiology, and Development. Walter de Gruyter, Berlin, New York, pp. 9-22. 2003.
- KROMBEIN, K. V. Biosystematic Studies of Ceylonese Wasps, XIV: A Revision of *Carinostigmus* Tsuneki (Hymenoptera: Sphecoidea: Pemphredonidae). **Smithsonian Institution Press**, n. 396, p.1-37 1984.

- KRUEGER, S. et al. Sternal gland structures in males of bean flower thrips, *Megalurothrips sjostedti*, and poinsettia thrips, *Echinothrips americanus*, in comparison with those of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). **Arthropod Structure & Development**, v. 44, n. 5, p. 455-467, 2015.
- LEONHARDT, S. D. et al. Ecology and evolution of communication in social insects. **Cell**, v. 164, n. 6, p. 1277-1287, 2016.
- LEVINSON, A.; LEVINSON, H. Reflections on structure and function of pheromone glands in storage insect species. **Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz**, v. 68, n. 5, p. 99-118, 1995.
- MELO, G. A. R. Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera), with emphasis on crabronid wasps. **Scientific Papers of Natural History Museum of the University of Kansas**, 14, p. 1-55. 1999.
- MELO, G. A. R. Comportamento social de vespas da família Sphecidae (Hymenoptera: Apoidea). **Oecologia Brasiliensis**, v. 8, n. 1, p. 4, 2000.
- MIKÓ, I. et al. Revision of *Trassedia* (Hymenoptera: Ceraphronidae), an Evolutionary Relict With an Unusual Distribution. **Insect Systematics and Diversity**, v. 2, n. 6, p. 4, 2018.
- MORAES, S.; DUARTE, M. Morfologia externa comparada das três espécies do complexo *Telchin licus* (Drury) (Lepidoptera: Castniidae) com uma sinonímia. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 2, 2009.
- NEEDHAM, J. G. **A genealogic study of dragon-fly wing venation**. US Government Printing Office, 1903.
- NOIROT, C.; QUENNEDEY, A. Glands, gland cells, glandular units: some comments on terminology and classification. In: **Annales de la Société entomologique de France**. Société entomologique de France, 1991. p. 123-128.
- NOIROT, C.; QUENNEDEY, A. Fine structure of insect epidermal glands. **Annual Review of Entomology**, v. 19, n. 1, p. 61-80, 1974.
- NORBERG, R. Å. The pterostigma of insect wings an inertial regulator of wing pitch. **Journal of Comparative Physiology**, v. 81, n. 1, p. 9-22, 1972.
- PASS, G. Beyond aerodynamics: The critical roles of the circulatory and tracheal systems in maintaining insect wing functionality. **Arthropod Structure & Development**, v. 47, n. 4, p. 391-407, 2018.

- PULAWSKI, W. J. **Catalog of Sphecidae sensu lato**. Disponível em: <[http://research.calacademy.org/ent/catalog\\_sphecidae](http://research.calacademy.org/ent/catalog_sphecidae)>. (acesso em 28 de dezembro de 2018).
- QUENNEDEY, A. Insect epidermal gland cells: ultrastructure and morphogenesis. In: **Microscopic Anatomy of Invertebrates. Vol 11A, Insecta**, p. 177-207, 1998.
- SCHINDLER, M. et al. Courtship behaviour in the genus *Nomada*—antennal grabbing and possible transfer of male secretions. **Journal of Hymenoptera Research**, v. 65, p. 47, 2018.
- SCOTLAND, R. W.; OLMSTEAD, R. G.; BENNETT, J. R. Phylogeny reconstruction: the role of morphology. **Systematic Biology**, v. 52, n. 4, p. 539-548, 2003.
- STEINBRECHT, R. A. Feinstruktur und Histochemie der Sexualduftdrüse des Seidenspinners *Bombyx mori* L. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, v. 64, n. 2, p. 227-261, 1964.
- STROHM, E.; HERZNER, G.; GOETTLER, W. A ‘social’ gland in a solitary wasp? The postpharyngeal gland of female European beewolves (Hymenoptera, Crabronidae). **Arthropod Structure & Development**, v. 36, n. 2, p. 113-122, 2007.
- SYMONDS, M. RE; ELGAR, M. A. The evolution of pheromone diversity. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 23, n. 4, p. 220-228, 2008.
- VAN HEERDEN, H. P. Some histological methods of interest to entomologists. **Journal of the Entomological Society of Southern Africa**, v. 8, n. 2, p. 157-161, 1945.
- WANG, Z.; HUA, B. Ultrastructure of the single-chamber stemmata of *Arge pagana* (Panzer, 1798) (Hymenoptera: Argidae). **Arthropod Structure & Development**, v. 47, n. 6, p. 614-621, 2018.
- WEISS, K. et al. Comparative morphology of the postpharyngeal gland in the Philanthinae (Hymenoptera, Crabronidae) and the evolution of an antimicrobial brood protection mechanism. **BMC Evolutionary Biology**, v. 15, n. 1, p. 291, 2015.
- WEISS, K.; HERZNER, G.; STROHM, E. Sexual selection and the evolution of male pheromone glands in philanthine wasps (Hymenoptera, Crabronidae). **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, n. 1, p. 128, 2017.

- WOODARD, S. H. et al. Genes involved in convergent evolution of eusociality in bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 18, p. 7472-7477, 2011.
- WOOTTON, R. J. Functional morphology of insect wings. **Annual review of entomology**, v. 37, n. 1, p. 113-140, 1992.
- ZHAO, H. X.; YIN, Y. Nano fibrous multilayered composites in pterostigma of dragonfly. **Chinese Science Bulletin**, v. 55, n. 18, p. 1856-1858, 2010.



## APÊNDICE A – Protocolo para fixação, inclusão, corte e coloração de asas em Apoidea

### Protocolo Dissertação

#### Dissecção de animais vivos e primeira fixação

1. Planeje bem a quantidade de amostras necessárias, a fim de evitar sacrifícios desnecessários de animais. O ideal é UM espécime bem fixado. Preferencialmente as amostras devem ser fixadas e as etapas posteriores devem ser executadas sem interrupções. Eventualmente, em casos em que não seja possível efetuar as etapas seguintes no mesmo dia, as amostras podem ser mantidas por algumas semanas a 4°C. Acondicionamentos por tempos prolongados podem causar degradação celular que será refletida na visualização das imagens.
2. Para a dissecção, encha uma placa de Petri com o fixador e tente sempre submergir a parte de interesse sob o fixador. Para pequenos espécimes, é interessante a completa submersão do indivíduo durante a dissecção. Utilize lâminas afiadas e tesouras entomológicas quando necessário para que sejam feitos cortes precisos (atenção: não quebrar a cutícula, com cuidado, faça finas incisões). Tente fazer cortes somente da estrutura de interesse em pequenas dimensões e espessuras para que se obtenha uma melhor fixação.
3. Após dissecção da região de interesse (i.e. asa), transfira as amostras para *ependorfs* com etiquetas individuais contendo o fixador resfriado. Repita esse procedimento para todas as partes de interesse que forem dissecadas. Quando não for possível dar continuidade ao protocolo, as amostras podem ser acondicionadas em refrigerador a 4°C. Neste trabalho, o tempo de fixação variou de 2-12h.

#### Pós-fixação

Solução aquosa de Tetróxido de Ósmio

1. Lave as amostras em solução tampão. Dica para todas as trocas líquidas: não remova todo o líquido dos *ependorfs*, sempre deixe as amostras submersas.
2. Manuseie o Ósmio com CUIDADO, é um composto muito tóxico. Troque o tampão pela solução de Ósmio no próprio *ependorf*, o suficiente para submergir a amostra.
3. Deixe fixar por até 2 horas no refrigerador (4°C) envoltos em papel alumínio pois ele precipita com a luz.
4. Lave as amostras em solução tampão novamente, mantendo as amostras em refrigerador (4°C). Prosseguir o processo para a inclusão.
5. Lembrar que todos os resíduos gerados durante o procedimento são altamente tóxicos. Devendo ser lacrados em recipientes apropriados e descartados com etiquetas indicando o composto e a concentração do mesmo.

#### Inclusão em resina Poly/Bed® 812

1. Desidratação 1 em série crescente de Etanol/água destilada: 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%. Oliveira-Ribeiro e colaboradores (2012) sugerem apenas 15 min

para amostras de invertebrados muito pequenas. O etanol absoluto deve ser trocado duas vezes para garantir a desidratação absoluta. O etanol deve ser de boa qualidade.

2. Desidratação 2 em Óxido de propileno: Com o auxílio de uma micropipeta é feita a postura do óxido em *eppendorfs*, visto que o mesmo é muito volátil e em pipetas normais há perda de reagente. As amostras são desidratadas em duas etapas de 15 minutos cada.
3. Inclusão gradual: Checar as especificações dos kits de inclusão. É comum seguir as proporções seguintes: Óxido de propileno/Resina 2:1 durante 6 horas; 1:1 *overnight*; 1:3 6 horas; resina pura *overnight*. Se possível, deixe as amostras girando lentamente para aumentar a penetração. Alguns pesquisadores recomendam que durante a fase 1:3 o *eppendorf* deve estar com a tampa aberta para que o óxido de propileno possa evaporar.
4. Preencha as formas de bloquinhos com a resina recém preparada e oriente suas amostras. Cheque o kit de instruções para o tempo de inclusão. Geralmente ~48-72 horas a 60°C.
5. Todo o material utilizado com resíduos de resina (i.e. luvas, seringas, *eppendorfs*) devem ser colocados para polimerizar em estufa, podendo assim serem descartados em lixo comum.

### **Corte do material**

1. Após a retirada da estufa, aguarde que a forma esfrie para que seja feita a retirada dos blocos.
2. Após a trimagem o bloco estará pronto para corte.

### **Coloração e Constrastação**

1. Após serem obtidos os cortes semifinos, os mesmos são dispostos em lâmina de vidro em gotas de água destilada. Os cortes são levados para secar em chapa aquecedora por alguns segundos (ajustar a temperatura e observar quando a água for secando). Após isso, são corados com gotas de Azul de Toluidina 1% por aproximadamente 2-5 segundos (o tempo varia para cada material) e novamente lavados em água destilada e levados para placa aquecedora. Os cortes estão prontos para serem observados em microscópio de luz convencional. Para confecção de lâminas permanentes, gotas de Enthellan® são colocadas sobre os cortes os quais são cobertos com lamínulas de vidro. Após isso já estão prontos para visualização em microscópio de luz e execução de fotografias das lâminas.
2. Para cortes ultrafinos, os cortes são “pescados” com as telinhas de cobre e acondicionada em estojo para posterior contrastação. A contrastação deve ser feita, preferencialmente, um dia antes da visualização em microscópio eletrônico. Para constrastação seguir os seguintes procedimentos
  - 2.2. Centrifugar o citrato de chumbo por 20 minutos
  - 2.3. Em uma placa de Petri forrada com parafilme e com números para identificação das telas, goteje Acetato de Uranila 3% em solução aquosa e deixe as amostras por 20 minutos. Cubra as amostras com placa revestida de papel

alumínio e desligue as luzes do ambiente para que não haja precipitação de Uranila.

- 2.4. Retire as amostras da solução de Uranila e lave cuidadosamente em água destilada (5 vezes), após isso coloque as amostras em papel filtro para secar.
- 2.5. Da mesma maneira, coloque gotas de citrato de chumbo já centrifugado em uma placa de Petri forrada com parafilme. Atenção: retirar a solução de chumbo da superfície e não do fundo do *eppendorf*, caso contrário, a centrifugação terá sido em vão. Coloque as amostras deixando-as por 5 minutos. Durante a contrastação por chumbo é interessante colocar grânulos de Hidróxido de sódio para retirar o  $\text{CO}_2$  que pode precipitar na imagem final.
- 2.6. Remova as amostras da solução de citrato de chumbo e lave cuidadosamente em água destilada (5 vezes) e as coloque em papel filtro para secagem.
- 2.7. Guarde as amostras em um estojo de telinhas. Elas estão prontas para serem analisadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão fotografadas.

## APÊNDICE B – Formulação e tempos de ação de reagentes

### Composição das soluções

	Concentração inicial	Concentração final	Volume/Peso	Tempo
<b>Solução fixadora</b>				<b>2-12h</b>
Glutaraldeído	25%	2,5%	2ml	
Sacarose	5%	2,5%	10ml	
Tampão Cacodilato	0,2M	0,1M	5ml	
Água destilada			3ml	
<b>Volume total</b>			<b>20 ml</b>	
Pós Fixação Ósmio	2%	1%		<b>1-2h</b>
Tampão Cacodilato	0,2M	0,1M		
pH final da reação		7, 2 – 7,4		
<b>Formulação resina</b>				
Poly/ Bed			25 g	
DDSA			15,5 g	
NMA			22,5 g	
DMP30*			1,25 g	
<b>Volume total</b>			<b>64,25 g</b>	

\*Deve ser colocado somente minutos antes do uso.

## **DURAÇÃO DE ETAPAS DE EMBLOCAGEM**

### **1. FIXAÇÃO**

Duração: 2- 12h

### **2. LAVAGEM**

Tampão Cacodilato 0,1 M – 3x de 10 min cada

### **4. PÓS-FIXAÇÃO**

Tetróxido de ósmio 1% em tampão Caco – 1 – 2 horas

### **4. LAVAGEM**

Tampão Cacodilato 0,1 M – 3x de 10 min cada

### **5. DESIDRATAÇÃO 1 – Etanol/ Água destilada**

30% – 15 min    70% – 15 min    100% – 15 min

50% – 15 min    80% – 15 min    100% – 15 min

60% – 15 min    90% – 15 min

### **6. DESIDRATAÇÃO 2 – Óxido de Propileno (O.P.)**

2 x de 15 min cada

### **7. INFILTRAÇÃO EM POLY/BED®**

O.P./ resina (2:1): 6 horas

O.P./ resina (1:1): overnight

O.P./ resina (1:3): 6 horas

Resina pura: overnight

### **8. EMBLOCAGEM**

Orientação das amostras em forma de silicone

### **9. DESSECADOR VÁCUO - 12 horas (overnight)**

### **10. POLIMERIZAÇÃO**

Estufa 60°C por 48-72 horas



### APÊNDICE C – Dificuldades metodológicas em inclusão

Durante os experimentos, devido a natureza do material biológico, foram encontrados alguns empecilhos na emblocagem que resultaram em problemas no corte do material. Os primeiros experimentos contaram com a formulação *soft* (proporções descritas no manual de instruções da resina) de Poly/Bed® com duração de duas horas em cada etapa de inclusão gradual. Provavelmente pela baixa penetração da resina, no momento do corte as amostras biológicas se soltavam do bloco de resina impossibilitando a realização do corte, ocasionando quebras de cutículas e/ou dobras nos cortes (Fig. 24 C–F). Uma alternativa encontrada foi aumentar a dureza da resina para a proporção *hard*, assim como aumentar o tempo de inclusão nas etapas de infiltração (Apêndice A). A partir destas modificações foi possível efetuar o corte semifino das espécies de Stigmina. No entanto, eventualmente alguns cortes ainda se separavam da resina. Foi observado que, em espessuras mais finas, os cortes tinham tendência a maior deformidade. Dessa forma, a espessura ótima encontrada variava entre 1200-1500 nm, sendo a última espessura escolhida para realização dos cortes durante a microtomia.

Para a ultra-estrutura os problemas foram ainda mais notáveis, e não foi obtido sucesso com nenhuma das espécies utilizadas, mesmo com a adequação do protocolo. Durante a visualização em microscópio eletrônico, os cortes não suportavam o feixe de elétrons e se rompiam impossibilitando a formação da imagem (Fig. 24 A e B). Mesmo assim, poucos cortes permaneciam retidos na resina, formando um espaço entre a resina e a cutícula, apresentando problema semelhante ao descrito para os cortes semifinos quando utilizada a proporção *soft* da resina.

O estudo das glândulas exócrinas e compostos associados apresentam dificuldades práticas que são reconhecidas há muito tempo. Isto se deve ao fato da origem ectodérmica destas estruturas, tornando-as associadas diretamente à cutícula, resultando em consideráveis problemas na inclusão (BILLEN & MORGAN, 1998). Alternativamente, a utilização de resinas plásticas para emblocagem e navalhas de vidro ou diamante facilitou o corte do integumento de cutículas rígidas nos últimos anos (BILLEN, 2009).

No presente estudo, utilizamos protocolos e resina rotineiramente empregados no estudo de morfologia de insetos. Bergmann e colaboradores (2018), em análise ultra-estrutural da asa posterior de um Pentatomidae, utilizaram a mesma resina do presente estudo e obtiveram sucesso em seus cortes histológicos. Curiosamente, os problemas de inclusão aqui reportados foram mais evidentes para as espécies de Stigmina, sendo que os outros gêneros analisados os cortes foram desenvolvidos sem grandes problemas. Franielczyk-Pietryra & Wegierek (2017), em descrição da asa de uma espécie de afídeo, também obtiveram

artefatos durante a microtomia. Provavelmente estes problemas estão ligados a alguma especificidade na natureza da cutícula destes animais. Uma alternativa seria a criação de novos protocolos que incluam um aumento de tempo de inclusão ou a mudança para uma resina mais solúvel (como as utilizadas para células vegetais), que poderia acelerar a penetração através da cutícula.

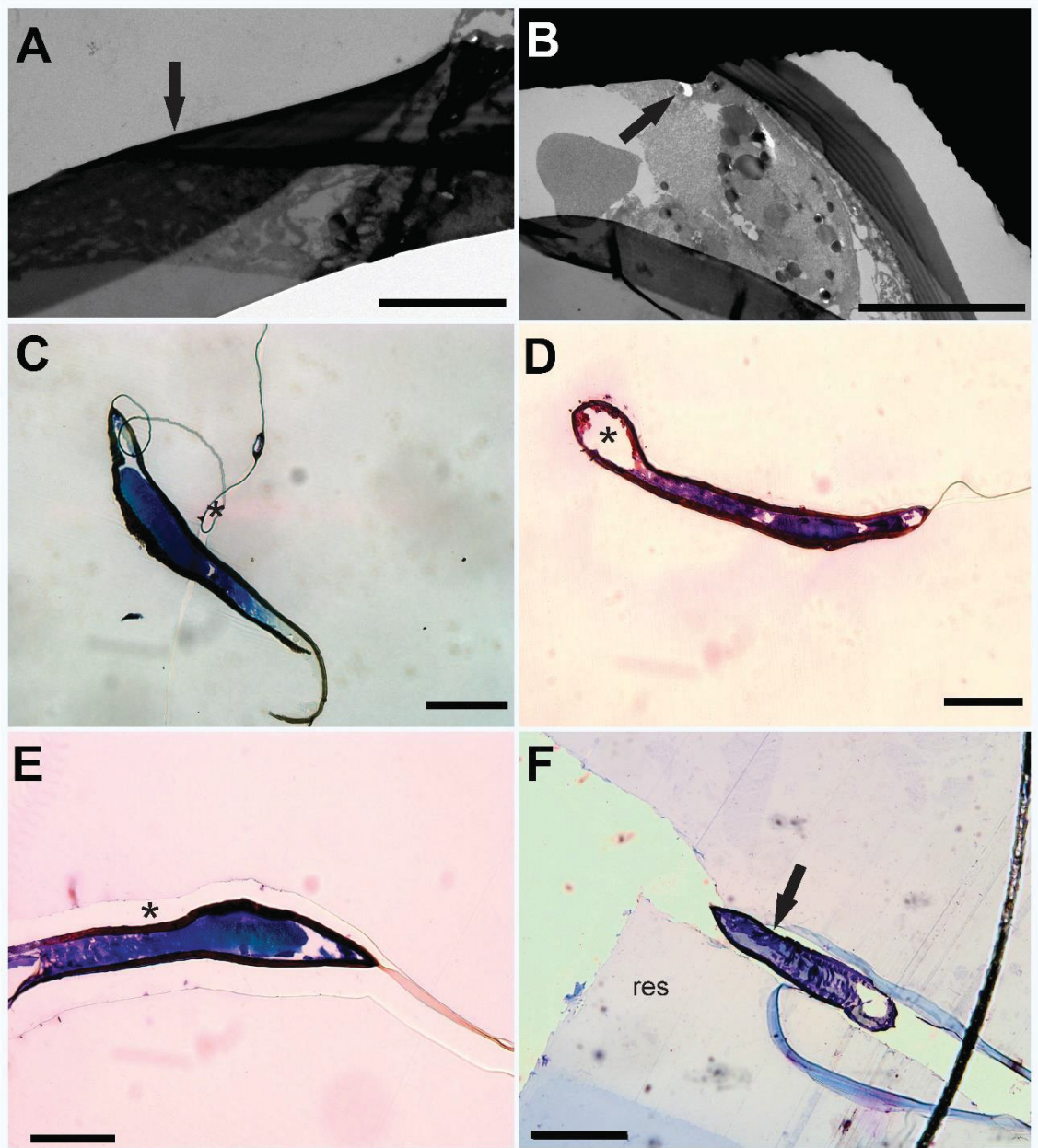


Figura 25 Artefatos de inclusão em espécies de *Stigmina*: (A e B) (setas) dobras e rasgos em imagens de ultraestrutura; (C e E), (\*) cortes semifinos desprendendo-se da resina; (D) (\*) dificuldades de preservação de estruturas internas; (F)(seta) completa não-inclusão do material biológico na resina (res). Escalas: Fig. A: 5 $\mu$ m; Fig.B: 10  $\mu$ m; Figs. C–F: 50  $\mu$ m

APÊNDICE D – Indivíduos utilizados para descrição do pterostigma em  
Hymenoptera

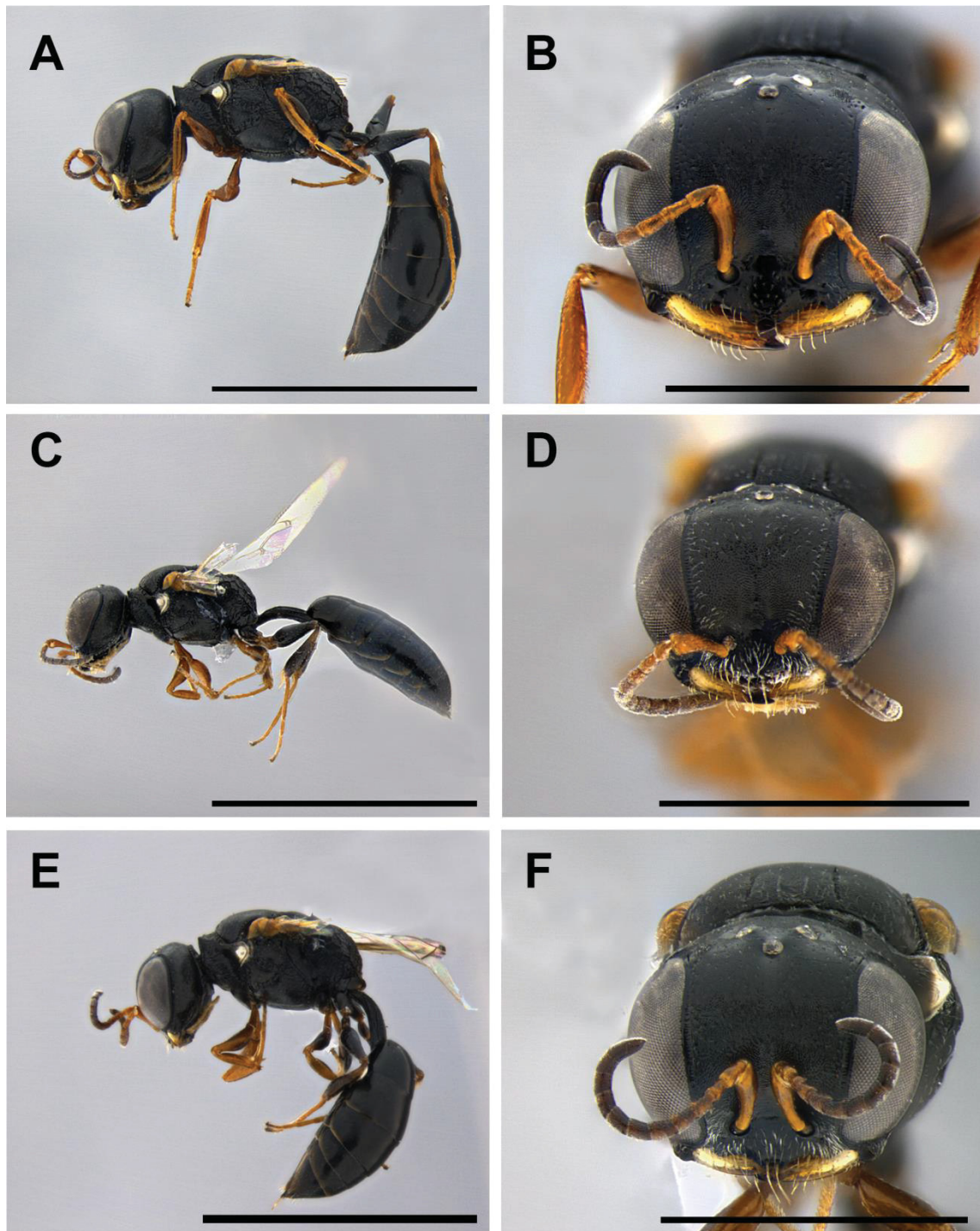


Figura 26 Hábito em vista lateral e cabeça em vista frontal de espécies de vespas apoideas do gênero *Incastigmus* (A–F): (A, B) *Incastigmus pycnoglypticus* (fêmea); (C, D) *I. ictericornis* (macho); (E, F) *I. ictericornis* (fêmea). Escalas: Figs. A, C e E 1,0mm e Figs. B, D e F: 0,5mm



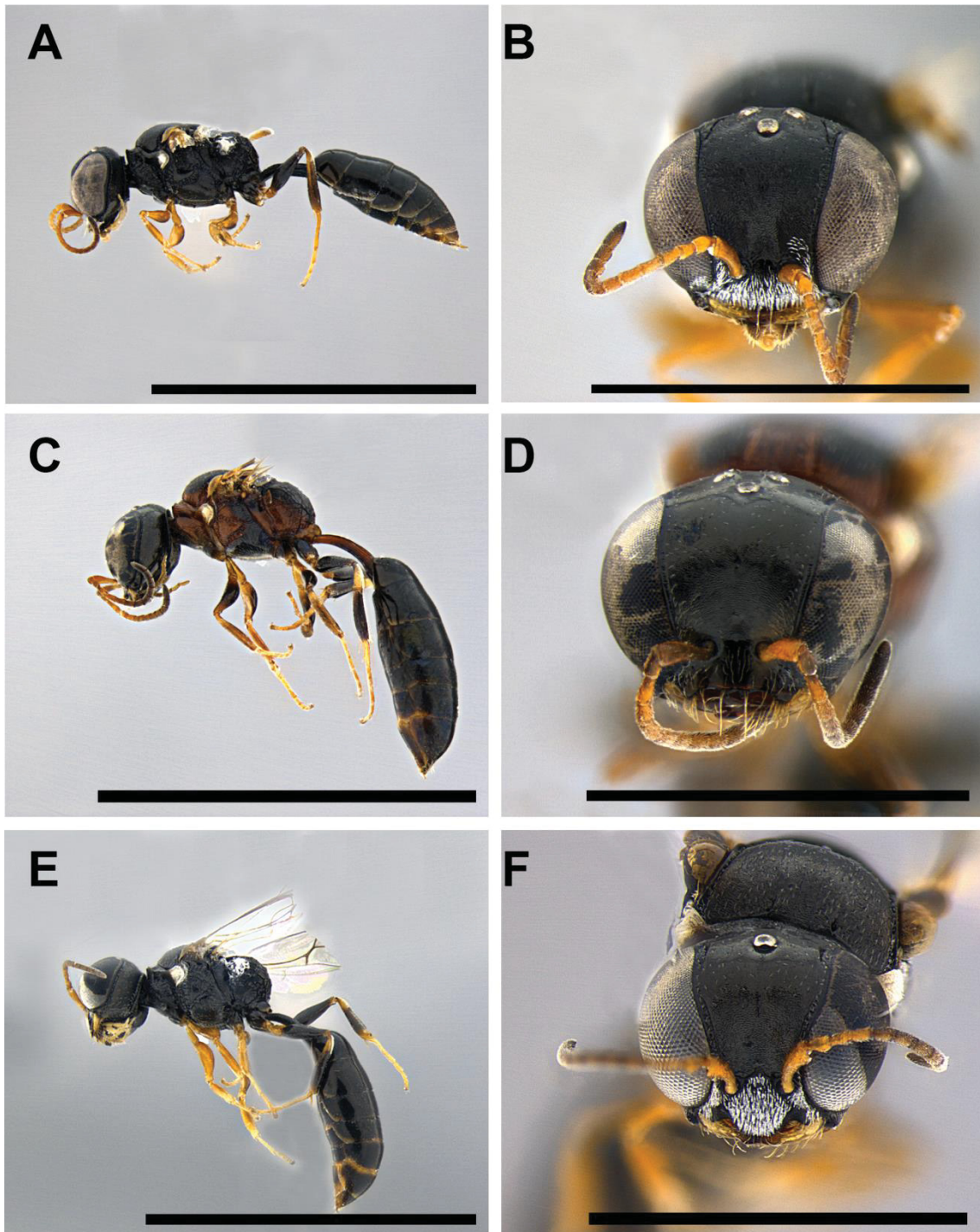


Figura 27 Hábito em vista lateral e cabeça em vista frontal de espécies de vespas apoideas dos gêneros *Incastigmus*, *Llaqhastigmus* e *Stigmus* (A–F): *I. neotropicus* (macho); (C, D) *Llaqhastigmus mantanti* (fêmea); (E, F) *Stigmus* sp (macho). Escalas: Figs. A, C e E 1,0mm e Figs. B, D e F: 0,5mm.

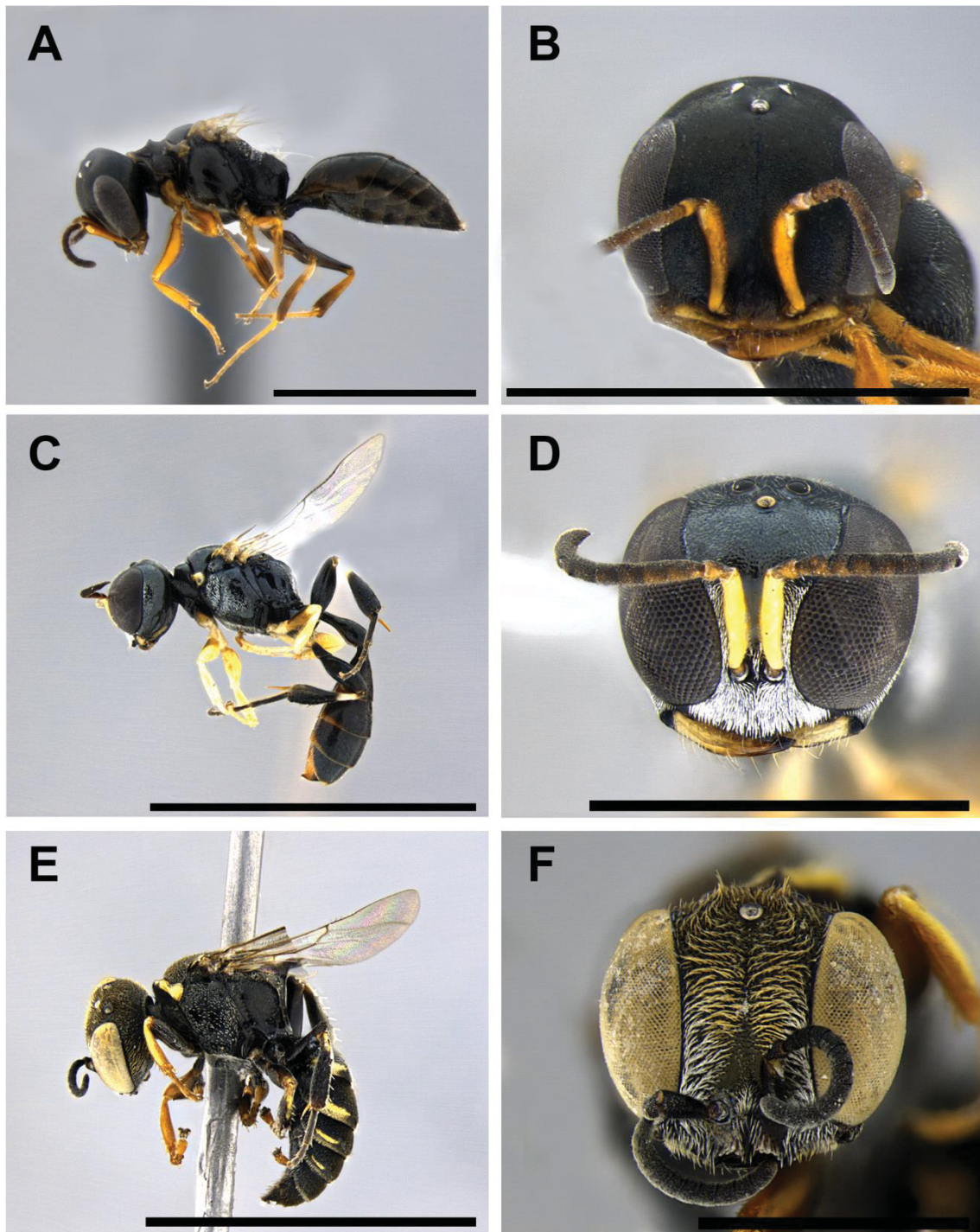


Figura 28 Hábito em vista lateral e cabeça em vista frontal de espécies de vespas apoideas dos gêneros *Spilomena*, *Rhopalum* e *Oxybelus* (A–F): (A, B) *Spilomena* sp. (fêmea); (C, D) *Rhopalum* sp. (macho) e (E, F) *Oxybelus* sp. (macho). Escalas: Figs. A,B,D, E 0,5mm; C 1,0mm e Figs. B, D e F: 0,5mm



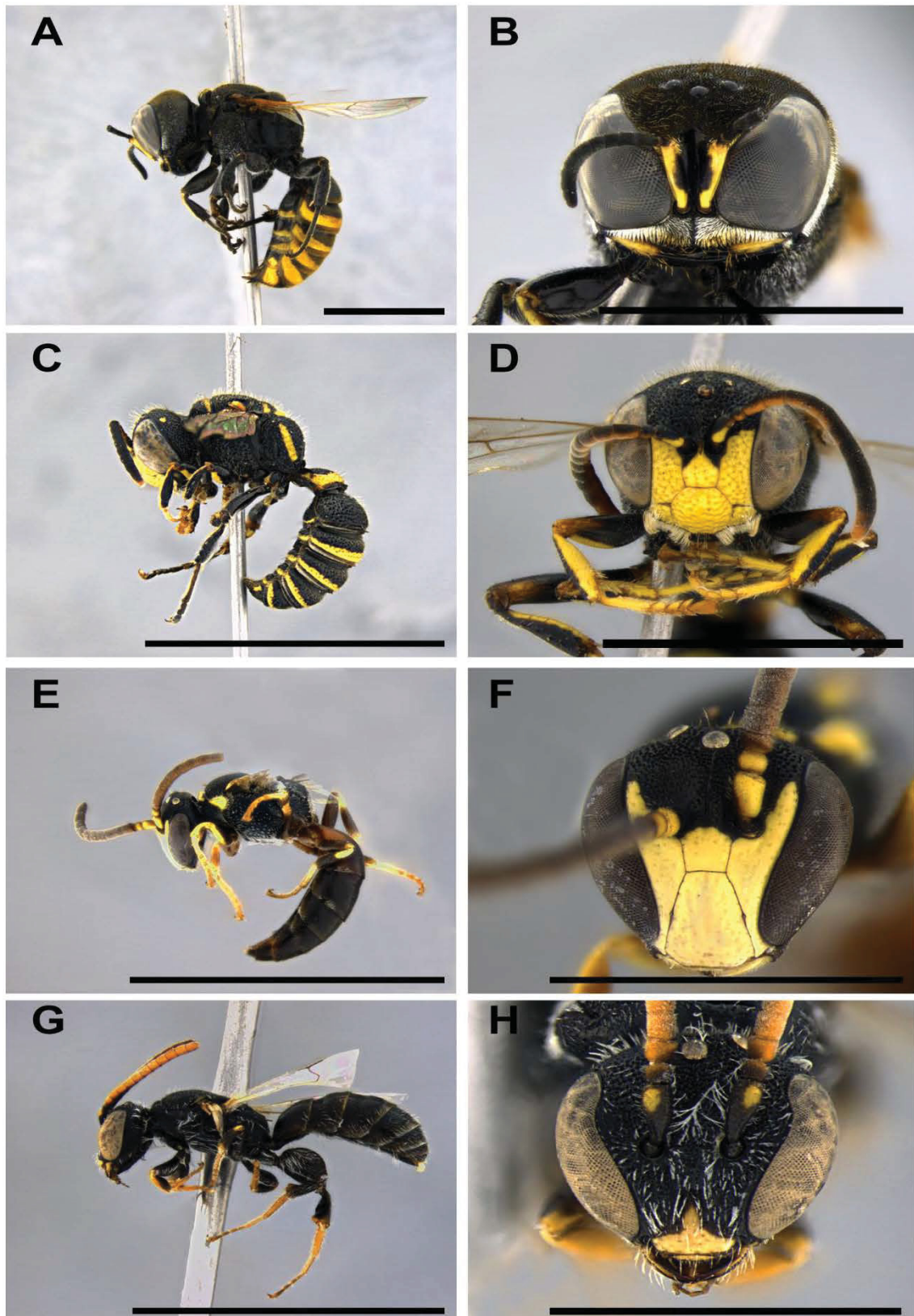


Figura 29 Hábito em vista lateral e cabeça em vista frontal de espécies de vespas apoideas e abelhas dos gêneros *Ectemnius*, *Cerceris*, *Hylaeus* e *Chilicola* (A–H): (A, B) *Ectemnius* sp. (fêmea); (C, D) *Cerceris* sp. (macho); (E, F) *Hylaeus* sp. (fêmea); (G, H) *Chilicola* sp. (macho). Escalas: Figs. A, B, C, D, E, G 1,0mm; Figs. F e H, 0,5mm